

Compostos responsáveis pelo “*off-flavour*” da cerveja:

caracterização e impacto sensorial

Samira Patricia dos Reis
Borges Teixeira

Mestrado em Tecnologia e Ciência
Alimentar
Departamento Química e Bioquímica
2015/2016

Orientadores

Luís Ferreira Guido, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade
do Porto

Ana Bela Pinheiro, Gestora do DQST da
UNICER - Bebidas de Portugal SGPS,
SA





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



***O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é
no dicionário.”***

Einstein

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado. A todos eles deixo aqui o meu profundo e sincero agradecimento:

- Ao Professor Luís Ferreira Guido, meu orientador, pela disponibilidade e simpatia, pelas suas sugestões e pelo apoio, interesse e rigor científico sempre demonstrados.
- À Doutora Ana Bela Pinheiro, Gestora do DQST da UNICER - Bebidas de Portugal SGPS, SA, minha orientadora, pela disponibilidade, sugestões, simpatia e rigor demonstrados.
- À empresa cervejeira UNICER - Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio, pelo acolhimento, pelas condições disponibilizadas e pela oportunidade concedida para a realização do estágio no departamento de Qualidade, Ambiente e Segurança.
- Às Eng^{as} Cláudia Teixeira e Helena Cunha, Técnicas Superiores do DQST da UNICER, pela disponibilidade, simpatia e acolhimento no departamento de Qualidade da UNICER.
- Aos Professores de Química Analítica pelo acolhimento, pela simpatia e pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.
- A todos os colegas do grupo de pesquisa de Química Analítica e Qualidade Alimentar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em especial ao Daniel e à Inês pela simpatia, interesse, disponibilidade e apoio sempre demonstrados.
- À Dr.^a Zélia Azevedo pela orientação, disponibilidade e rigor sempre demonstrados.
- À Maria Celeste Cunha pela preciosa ajuda, disponibilidade, interesse e rigor sempre demonstrados.
- À minha mãe e à minha avó, meus eternos anjos da guarda, obrigado pelo esforço ao longo de todos estes anos, e a toda a minha “família” por terem estado sempre ao meu lado, por nunca me deixarem baixar os braços e desistir.
- Ao Nuno, obrigada por me acompanhar em todos os momentos, mesmos naqueles em que a “viagem é longa” e o destino incerto.
- Aos meus colegas de Mestrado que fizeram com que o meu percurso académico fosse muito divertido.

Resumo

A estabilidade organolética da cerveja é uma grande preocupação para a indústria cervejeira, uma vez que as características organoléticas da cerveja podem ser sujeitas a significativas alterações químicas durante o período de armazenamento, o que altera as suas propriedades sensoriais. Dependendo do tipo de cerveja e das condições de armazenamento, uma variedade de aromas e sabores podem surgir e influenciar de forma significativa a aceitabilidade do produto por parte do consumidor.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da temperatura de armazenamento e do oxigénio na estabilidade organolética da cerveja. Paralelamente, o perfil de alguns compostos voláteis, tais como fenilacetaldéido, feniletilacetato e etilfenilacetato, responsáveis pelo desenvolvimento de aromas e sabores doces e a mel, foi monitorizado durante o envelhecimento natural (20°C durante 6 meses) e o envelhecimento forçado (3,5,7 e 14 dias a 37°C). As cervejas mantidas a 4°C foram utilizadas como controlo. A estabilidade organolética foi avaliada por um painel de provadores treinados, e os dados sensoriais foram comparados com o perfil de compostos voláteis obtido.

Os teores de fenilacetaldéido, feniletilacetato e etilfenilacetato foram determinados por cromatografia gasosa (perfil cromatográfico e iões (m/z) principais), após extração com diclorometano e utilizando 3-octanol como padrão interno.

Estes compostos voláteis foram negativamente correlacionados com a qualidade organolética da cerveja, pelo painel sensorial. Tanto o feniletilacetato e o fenilacetaldéido poderão ser utilizados como marcadores químicos e indicadores do envelhecimento da cerveja, uma vez que o aumento da concentração destes voláteis traduz-se numa diminuição da qualidade sensorial. Os resultados obtidos no estudo do impacto da temperatura na estabilidade organolética da cerveja demonstram que o feniletilacetato é o marcador químico que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética da cerveja, quando consideradas todas as temperaturas ($r = -0,69$, $p = -0,72$; $p < 0,05$). Na análise individual para cada temperatura verifica-se que a 20°C o feniletilacetato continua a ser o marcador químico que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética ($r = -0,82$; $p < 0,05$). No armazenamento a 4 e a 37°C já é o fenilacetaldéido que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética da cerveja ($r = -0,87$ e $r = -0,70$ respetivamente; $p < 0,05$).

O estudo do impacto do oxigénio a diferentes temperaturas de armazenamento na concentração do feniletilacetato e do fenilacetaldeído, permite-nos concluir que o teor de oxigénio associado ao armazenamento a 20°C tem um forte impacto na concentração do fenilacetaldeído, pois observa-se um aumento na concentração até 12 vezes relativamente à concentração inicial nos teores deste volátil.

O feniletilacetato demonstra ser um melhor marcador químico de temperatura do que o fenilacetaldeído, no caso particular do armazenamento a 20°C, registam-se aumentos no teor de feniletilacetato até 6 vezes superior à concentração inicial. Já o fenilacetaldeído demonstrou ser, na presença de oxigénio, o melhor marcador químico de envelhecimento da cerveja durante o armazenamento a 20°C, pois registam-se aumentos no teor de fenilacetaldeído até 12 vezes superior à concentração inicial.

Abstract

Beer stability is a major concern for the brewing industry, as beer characteristics may be subject to significant chemical changes during storage. A variety of flavors may arise, depending on the beer type and the storage conditions.

This work aims to evaluating the impact of storage temperature and oxygen on beer flavor stability. The profile of some volatile compounds, such as phenylacetaldehyde, phenylethyl acetate and ethylphenyl acetate, responsible for the development of sweet and honey like flavors, has been monitored throughout natural (20°C during six months) and forced aging (3, 5, 7 and 14 days at 37°C). Beers maintained at 4°C have been used as controls. A well-trained sensory panel has further evaluated the flavor stability of beers, and the sensory data was compared with volatile compounds profile.

Phenylacetaldehyde, phenylethyl acetate and ethylphenyl acetate contents have been determined by gas chromatography–mass spectrometry (chromatographic profile and m/z pattern of fragmentation), after extraction with dichloromethane and using 3-octanol as internal standard.

These volatile compounds were negatively correlated with organoleptic quality of the beer by the sensory panel. It is noted that increasing the storage temperature and the time of storage an increase of these volatile contents was observed, leading to a reduction in sensory quality. Phenylethyl acetate and phenylacetaldehyde can be used both as possible chemical indicators markers of beer aging, since the increase on the concentration of these volatile corresponds to a reduction in sensory quality. The results obtained from the study of the impact of the temperature on the organoleptic stability of beer demonstrate that phenylethyl acetate is the chemical marker correlating better with the organoleptic stability of beer, when all temperatures are considered ($r = -0.69$; $p = -0.72$; $p < 0.05$). For the individual analysis at each temperature it is found that at 20°C phenylethyl acetate remains the chemical marker that best correlates with the organoleptic stability of beer ($r = -0.82$; $p < 0.05$). During storage at 4°C and 37°C phenylacetaldehyde is the best chemical compounds that correlates with the organoleptic stability of beer ($r = -0.87$ and $r = -0.70$ respectively; $p < 0.05$).

The study of the impacts of oxygen at different storage temperatures on the concentration of phenylethyl acetate and phenylacetaldehyde, allows us to conclude that the oxygen content associated with the storage at 20°C has a strong impact on the

concentration of phenylacetaldehyde as observed by 12-fold increase in concentrations compared to the initial concentration of this volatile.

Phenylethyl acetate proves to be a better chemical marker of temperature than phenylacetaldehyde. During storage at 20°C, an increase up to 6-fold higher than the initial concentration of phenylethyl acetate was observed. On the other hand, phenylacetaldehyde can be considered the best chemical marker of the presence of oxygen during storage at 20 °C, as an increase up to 12-fold of the initial concentration was observed.

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract.....	IV
Índice Geral	VI
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas e Símbolos:.....	XI
Introdução	1
I. Enquadramento	2
i. Unicer-Bebidas de Portugal	2
ii. Cerveja Super Bock.....	3
1. Aspetos gerais sobre a cerveja	5
1.1. História da cerveja	6
1.2. Produção de cerveja.....	7
1.2.1. Matérias-primas.....	7
1.2.2. Processo Produtivo.....	8
1.3. Caracterização Sensorial da Cerveja	12
1.3.1. Estabilidade Organolética da Cerveja	14
1.4. Alterações Sensoriais Durante o Armazenamento.....	15
1.4.1.1. Influência do Teor de Oxigénio.....	16
1.4.1.2. Influência da Temperatura de Armazenamento.....	17
2. Compostos Voláteis Estudados.....	19
2.1. Fenilacetaldéído	20
2.2. 2-Feniletanol	22
2.3. Feniletilacetato	24
2.4. Etilfenilacetato	26
Objetivos do Trabalho	28
3. Procedimento Experimental	29
3.1. Caracterização da Amostra	30
3.2. Identificação de Voláteis	30
3.2.1. Plano de Amostragem.....	31
3.2.2. Materiais e Equipamentos	32

3.2.3.	Reagentes	33
3.2.4.	Preparação de soluções padrão	33
3.2.5.	Descrição do método de análise	34
3.2.5.1.	Técnica de Extração	35
3.2.5.2.	Condições Cromatográficas (GC-MS)	36
3.3.	Análise Sensorial	37
3.4.	Análise Estatística	38
4.	Resultados e Discussão	40
4.1.	Influência das condições de armazenamento na estabilidade organolética da cerveja	41
4.1.1.	Armazenamento a 4°C	41
4.1.2.	Armazenamento a 20°C	42
4.1.3.	Armazenamento a 37°C	43
4.2.	Análise Cromatográfica	45
4.2.1.	Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do feniletilacetato	45
4.2.2.	Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do fenilacetaldeído	48
4.2.3.	Influência do teor de oxigénio na concentração do feniletilacetato	50
4.2.4.	Influência do teor de oxigénio na concentração do fenilacetaldeído	53
4.3.	Análise Estatística	57
4.3.1.	Análise Sensorial versus Análise Cromatográfica	57
5.	Conclusão	63
5.1.	Perspetivas Futuras	65
	Referências Bibliográficas	67
	Anexo 1	i
	Anexo 2	v
	Anexo 3	vii
	Anexo 4	viii

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura acionista da Unicer [Fonte: Unicer].	3
Figura 2: Processo de produção da cerveja.	9
Figura 3: A roda dos aromas e sabores – The Beer Flavour Wheel, desenvolvido por Morten Meilgaard (Meilgaard 1970).	13
Figura 4: Diagrama de Dalglish -Representação esquemática das alterações sensoriais da cerveja ao longo do seu envelhecimento (Dalglish1977).	15
Figura 5: O impacto da temperatura na degradação sabor na cerveja (Bamforth2004).	18
Figura 6: Fórmula de estrutura do fenilacetaldéido.	20
Figura 7:Produção de fenilacetaldéido a partir da L-fenilalanina pela síntese de Ehrlich (Kamigana et al. 2006).	20
Figura 8: Fórmula de estrutura do 2-feniletanol.	22
Figura 9: Produção de 2-feniletanol a partir do fenilacetaldéido (Etschmann et al. 2002).	22
Figura 10: Fórmula de estrutura do feniletilacetato.	24
Figura 11: Produção de 2- feniletilacetato a partir do 2-feniletanol (Etschmann et al. 2005).	24
Figura 12:Fórmula de estrutura do etilfenilacetato.	26
Figura 13:Produção de etilfenilacetato a partir do fenilacetaldéido (Xuan Tian et al. 2015).	26
Figura 14: Ilustração do procedimento experimental realizado.	35
Figura 15:Exemplo de um cromatograma com a identificação dos padrões analisados e os tempos de retenção.	36
Figura 16: Ilustração do gradiente de temperatura utilizado na análise por GC-MS.	36
Figura 17: Representação gráfica da evolução da estabilidade organolética a 4°C.	41
Figura 18: Representação gráfica da evolução da estabilidade organolética a 20°C.	42
Figura 19: Representação gráfica da evolução da estabilidade organolética a 37°C.	43
Figura 20: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 4°C na concentração do feniletilacetato.	45
Figura 21: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 20°C na concentração do feniletilacetato.	46
Figura 22: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 37°C na concentração do feniletilacetato.	47
Figura 23: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 4°C na concentração do fenilacetaldéido.	48
Figura 24: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 20°C na concentração do fenilacetaldéido.	49
Figura 25: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 37°C na concentração do fenilacetaldéido.	49
Figura 26: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 4°C.	50
Figura 27: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 20°C.	51
Figura 28: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 37°C.	52

Figura 29: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 4°C.	53
Figura 30: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 20°C.	54
Figura 31: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 37°C.	55
Figura 32: Resultados obtidos por PCA para as 60 amostras de cerveja armazenadas a 4, 20 e 37°C (durante um período total de 6 meses de armazenamento) e as 3 variáveis consideradas.	58
Figura 33: Correlação entre a avaliação sensorial e a concentração de feniletilacetato para as diferentes temperaturas analisadas (4, 20 e 37°C) durante os 6 meses de armazenamento.	60
Figura 34: Correlação entre a avaliação sensorial e a concentração de fenilacetaldéido para as diferentes temperaturas analisadas (4, 20 e 37°C) durante os 6 meses de armazenamento.	61
Figura 35: Ilustração da correlação entre o feniletilacetato e o fenilacetaldéido.	61

Índice de Tabelas

Tabela 1: Especificações da cerveja Super Bock.....	4
Tabela 2: Propriedades físico-químicas do fenilacetaldéido	21
Tabela 3: Propriedades físico-químicas do 2-feniletanol.....	23
Tabela 4: Propriedades físico-químicas do feniletilacetato	25
Tabela 5: Propriedades físico-químicas do etilfenilacetato	27
Tabela 6: Níveis de SO ₂ Total, de CO ₂ e de Fenilalanina dos lotes de cervejas analisados.....	30
Tabela 7: Plano de amostragem para o estudo dos compostos voláteis durante o período de armazenamento	31
Tabela 8: Reagentes utilizados na preparação das soluções utilizadas.....	33
Tabela 9: Concentração das soluções padrão e volumes pipetados	34
Tabela 10: Parâmetros de análise por GC-MS. A negrito são indicados os iões (m/z) principais.....	37
Tabela 11: Plano de trabalho para a realização das provas de análise sensorial.....	38
Tabela 12: Coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman obtidos para as 3 variáveis em estudo. A negrito são indicados os valores significativamente estatísticos, para um nível de significância de 95%.	58
Tabela 13: Coeficiente de correlação de Pearson obtidos para as cervejas armazenadas a diferentes temperaturas. A negrito são indicados os valores significativamente estatísticos, para um nível de significância de 95%.	59
Tabela 14: Melhor subconjunto de variáveis explicativas obtidas através por MRL	62
Tabela 15: Teores de feniletilacetato registados durante a monitorização do impacto da temperatura de armazenamento.....	vii
Tabela 16: Teores de fenilacetaldéido registados durante a monitorização do impacto da temperatura de armazenamento.....	vii
Tabela 17: Teores de feniletilacetato registados durante a monitorização do impacto do teor de oxigénio.	viii
Tabela 18: Teores de fenilacetaldéido registados durante a monitorização do impacto do teor de oxigénio.	viii

Lista de Abreviaturas e Símbolos:

PCA	Análise de Componentes Principais
CAS	Chemical Abstracts Service
r	Coeficiente de Correlação de <i>Pearson</i>
ρ	Coeficiente de Correlação de <i>Spearman</i>
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês, Gas Chromatography)
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês, Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
°C	Graus Celsius
ISQ	Espectrômetro de massa quadrupolo
TQMS	Espectrômetro de massa triplo quadrupolo
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
μL	Microlitro
μg	Micrograma
min	Minutos
mL	Mililitro
3-Oct	3-Octanol
L	Litros
<i>ppm</i>	Parte por milhão
m/z	Razão entre a massa e a carga
MLR	Regressão Linear Múltipla
TP	Tara Perdida
TR	Tara Retornável
v/v	Volume/volume

Introdução

- I. Enquadramento
 - i. Unicer-Bebidas de Portugal
 - ii. Cerveja Super Bock
- 1. Aspetos gerais sobre a cerveja
 - 1.1. História da cerveja
 - 1.2. Produção de cerveja
 - 1.2.1. Matérias-primas
 - 1.2.2. Processo Produtivo
 - 1.3. Caracterização Sensorial da Cerveja
 - 1.3.1. Estabilidade Organolética da Cerveja
 - 1.4. Alterações Sensoriais Durante o Armazenamento
 - 1.4.1.1. Influência do Teor de Oxigénio
 - 1.4.1.2. Influência da Temperatura de Armazenamento
- 2. Compostos Voláteis Estudados
 - 2.1. Fenilacetaldéido
 - 2.2. 2-Feniletanol
 - 2.3. Feniletilacetato
 - 2.4. Etilfenilacetato

I. Enquadramento

A estabilidade organolética da cerveja é uma grande preocupação para a indústria cervejeira, uma vez que as características organoléticas da cerveja podem ser sujeitas a significativas alterações químicas durante o período de armazenamento, o que altera as suas propriedades sensoriais. Dependendo do tipo de cerveja e das condições de armazenamento uma variedade de sabores podem surgir e influenciar de forma significativa a aceitabilidade por parte dos consumidores.

O presente projeto de Dissertação de Mestrado em parceria com a empresa UNICER-Bebidas de Portugal resulta da realização de um trabalho de investigação em cervejas Super Bock em que o principal objetivo foi a identificação de marcadores químicos de envelhecimento responsáveis por “*off-flavours*” associados ao aroma/gosto doce, característico da perda de qualidade da Super Bock.

i. Unicer-Bebidas de Portugal

Com mais de um século de história, a UNICER - Bebidas de Portugal SGPS, SA é uma empresa líder no sector de bebidas em Portugal, tendo já expandido o seu negócio para além-fronteiras.

Fundada em 1890 sob a égide da CUFP - Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes SA, como resultado da fusão de sete fábricas de cerveja, a Unicer construiu um percurso longo e estável. Em 1977 é nacionalizada e dá-se a fusão da CUPF, da Copega (1972) e da Imperial (1973), dando origem à Unicer – União Cervejeira E.P, que manteve o seu capital público até 1990, ano em que é privatizada.

Atualmente o capital da empresa é detido maioritariamente (56%) pelo Grupo VIACER (BPI, Arsopi e Violas) e em 44% pelo Grupo Carlsberg (figura 1).

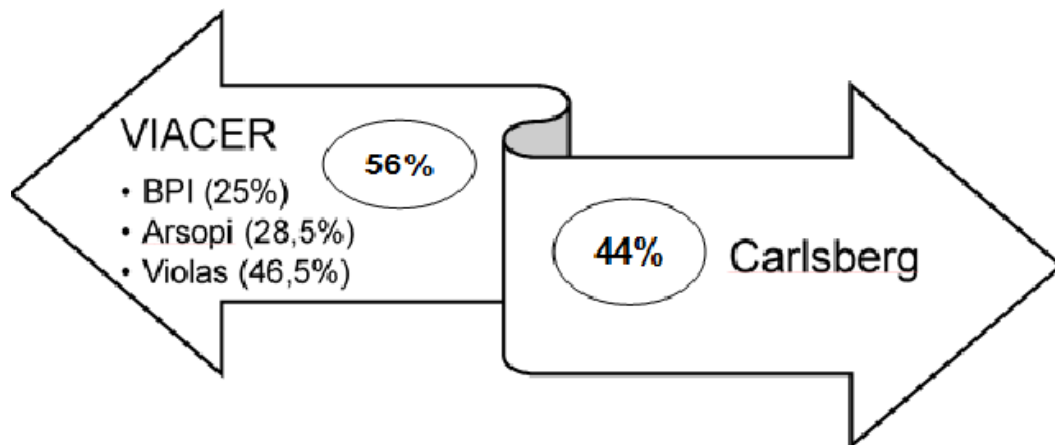


Figura 1: Estrutura acionista da Unicer [Fonte: Unicer].

A Unicer possui vários centros de produção por todo o país, sendo que o mais importante fica situado no Porto, mais concretamente em Leça do Balio. O centro de produção de Leça do Balio foi inaugurado a 28 de setembro de 1964. Em finais de 2003, é construído um novo Laboratório de Inovação e Desenvolvimento e uma instalação piloto para apoiar o desenvolvimento de novos produtos e processos de fabrico.

Em 2007, Leça do Balio recebe a primeira linha de enchimento de barril de tara perdida do mundo e, no ano seguinte, fazem-se novas apostas em inovação, com a construção da Mini-Malteria e da Mini-Fábrica, para a produção de cervejas especiais.

Os produtos desta empresa que apresentam maior destaque são as cervejas e as águas engarrafadas, dos quais se distinguem as marcas Super Bock, Cristal, Carlsberg, Água das Pedras e Vitalis, estando igualmente presente nos segmentos dos refrigerantes, dos vinhos, na produção e comercialização de malte e no negócio do turismo [1].

ii. Cerveja Super Bock

A marca Super Bock criada em 9 de novembro de 1927 conta já com mais de 80 anos de história, apresentando-se assim como uma das marcas portuguesas mais antigas e com maior notoriedade. O adjetivo Super remete para uma mais-valia, no que respeita às qualidades oferecidas por este tipo de cerveja. Bock significa um tipo de cerveja, caracterizado por ter um sabor mais forte, encorpado, geralmente de cor

escura, originalmente alemã, tem baixa fermentação e alto teor alcoólico, este correspondia ao tipo de cerveja que era inicialmente produzido.

Tabela 1: Especificações da cerveja Super Bock

Características do Produto:	Alcool (% v/v): 5,2 - Extrato Primitivo (% Plato): 10,85
Ingredientes:	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada), xarope de glucose, lúpulo.
Prazo de consumo preferencial:	12 meses - garrafa TP e lata 6 meses - garrafa TR
Capacidades:	0,20 L; 0,25 L; 0,33 L; 0,50 L; 1L. 5L; 20L
Cuidados a ter:	Proteger da luz, calor, humidade e odores fortes. Deve servir-se fresca.
Alergénios:	Malte de cevada e cevada

Contudo com as alterações no gosto dos consumidores, e tendendo para um mercado mais alargado, a cerveja passou, faseadamente, a ser uma *pilsener*, caracterizada por uma cor dourada e luminosa, de fino sabor e refrescante, e com um teor alcoólico de 5,2%, estando inserida no grupo das cervejas conhecidas como *Lagers* (cervejas de fermentação baixa¹).

Como características gerais (tabela 1) a Super Bock apresenta-se como sendo uma cerveja loira, brilhante e viva, com uma espuma pura, muito branca e cremosa. Um aroma fresco, ligeiramente maltado e frutado, de corpo médio e sabor equilibrado, com um amargo bem estruturado com o doce do malte e um fim de boca ligeiro e seco [2].

¹ Dependendo do tipo de levedura utilizada, as cervejas dividem-se em cervejas de fermentação baixa ou cervejas de fermentação alta. Nas cervejas de fermentação baixa a levedura deposita no fundo do tanque onde ocorre este processo resultando, habitualmente, uma cerveja mais clara e menos alcoólica. Nas cervejas que são produzidas por fermentação alta, a levedura fica em suspensão no mosto fermentado, dando origem a uma cerveja mais alcoólica, mais aromática e mais escura.

1. Aspetos gerais sobre a cerveja

Atualmente no mundo todo existem milhares de cervejas, que diferem entre si nos processos de fabrico e na seleção das matérias-primas utilizadas na sua produção. Descrevem-se seguidamente e de forma resumida, as características dos seis tipos de cerveja mais vulgarmente conhecidos:

Cerveja Alt – Este tipo de cerveja, de origem alemã, envolve no seu fabrico dois processos de fermentação: alta e baixa. Esta cerveja é caracterizada por possuir uma cor vermelha forte e um teor alcoólico que varia entre 4 e 5 graus.

Cerveja Stout – Este tipo de cerveja é originária da Irlanda e caracteriza-se por ser fabricada através de fermentação alta; é uma cerveja forte, escura e rica em lúpulo. Ao ser servida, oferece um bonito visual de cores combinando o branco da espuma com preto e um marrom dégradé. Possui um teor alcoólico que varia habitualmente entre 3 e 7 graus.

Cerveja Kriek Lambic – Esta cerveja tem a particularidade de conter frutas imersas no seu interior, como por exemplo, cerejas, pêssegos ou framboesas. Este tipo de cerveja é originária da região de Bruxelas. Possui entre 5 e 7 graus de álcool.

Cerveja Lager – A cerveja deste tipo tem a particularidade de no seu fabrico a etapa de fermentação decorrer a temperatura baixa, normalmente entre 0º C e 6º C, o que faz com que as leveduras se depositem no fundo, provocando uma fermentação muito lenta. Por tal facto, este tipo de cerveja possui uma graduação alcoólica que ronda os 3 e 5 graus.

Cerveja Amstel – Este tipo de cerveja é de origem holandesa. Detém um aroma espirituoso, rotundo e embriagador. Caracteriza-se, igualmente, por ser bastante equilibrada, levemente caramelizada e por possuir um ligeiro amargor com um final prolongado.

Cerveja Bock – Como já foi anteriormente dito, as cervejas deste tipo são encorpadas e possuem um teor alcoólico que varia normalmente entre 5 e 7 graus. O malte usado na sua preparação é mais torrado e caramelizado, o que transmite um sabor menos amargo. A sua espuma é cremosa e resulta do prolongado processo de maturação e fermentação.

1.1. História da cerveja

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. É obtida a partir de uma mistura de grãos de cereais, principalmente cevada na forma de malte, lúpulo e estirpes de leveduras selecionadas. A sua história inicia-se há milhares de anos atrás, sendo difícil precisar com exatidão o momento em que a bebida surgiu pela primeira vez [3].

Pensa-se que a origem da cerveja está relacionada com o facto de o ser humano ter abandonado os seus hábitos nómadas e de se ter dedicado à agricultura como principal meio de subsistência, o que terá acontecido há cerca de 10000 -15000 anos na região que se estende desde a Mesopotâmia até ao Egipto.

Os registos mais antigos de produção de cerveja referem o povo Sumério como os que terão descoberto, por acaso, o processo de fermentação da cevada. Esta civilização foi ainda capaz de repetir o processo, sendo, por isso, considerada a primeira cultura civilizada produtora de cerveja. Mais tarde todos os povos desta região como o povo da Babilónia e os Egípcios tinham enraizado na sua cultura a produção de cerveja [4].

Existem também evidências arqueológicas que remetem para o aparecimento desta bebida na China, onde estaria a ser produzida uma bebida fermentada a partir de uma mistura de arroz, mel e fruta, no sétimo milénio antes de Cristo [3].

No entanto a verdadeira origem da cerveja encontra-se perdida no tempo e ninguém pode afirmar, com rigor, o momento exato em que a primeira cerveja foi produzida.

Com a conquista do Egipto pelos Gregos, difunde-se a este povo a produção de cerveja, que mais tarde também se disseminará pelos Romanos. No entanto, nesta fase de expansão, a cerveja é tida como uma bebida menos importante e de carácter inferior ao vinho [4].

Na Idade Média ocorrem grandes desenvolvimentos na sua técnica de fabricação, que nesta altura decorria em mosteiros, o que teve um grande impacto sobre a cerveja fazendo com que esta adquirisse novamente grande importância. Os monges tentam melhorar o produto e dão grande importância ao uso do lúpulo, utilizada pela primeira vez pelo povo Germânico [3].

Após o período da Idade Média, em que a produção de cerveja sofre um revés, a ocorrência de diversas descobertas e acontecimentos permite uma melhoria na técnica e processo de fabricação da cerveja e na sua difusão pelo Mundo. Algumas dessas descobertas passam pela invenção da máquina a vapor por James Watt, a descoberta da refrigeração artificial por Carl Linde, o desenvolvimento dos caminhos-de-ferro permitindo assim a expansão deste produto, a invenção do método de pasteurização por Louis Pasteur, e por último a descoberta da levedura de fermentação baixa por *Emil Christian Hansen* [4].

De forma natural a cerveja foi-se difundindo pelas sociedades modernas, existindo hoje em dia variados tipos de cerveja e processos industriais capazes de fazer chegar este produto a nossa casa com a melhor qualidade possível.

1.2. Produção de cerveja

O processo de produção de cerveja tem como base científica e tecnológica diversos ramos da ciência, como é o caso da química, da bioquímica e da microbiologia e é de uma complexidade fascinante devido a todas as transformações que ocorrem nas matérias-primas até à obtenção de um produto final, envolvendo um profundo entendimento da química e bioquímica das matérias-primas, da levedura e de todas as variáveis intervenientes.

1.2.1. Matérias-primas

No que diz respeito às matérias-primas utilizadas no processo de produção de cerveja são essencialmente utilizados água, malte, lúpulo e levedura.

A água é o principal ingrediente da cerveja constituindo mais de 90% desta bebida, pelo que a qualidade da água utilizada no processo de fabrico deve respeitar determinadas características, tais como ter uma composição mineralógica adequada e ser potável, para que seja possível alcançar no final o sabor desejado. Outro parâmetro a ter em conta é o pH inicial da água, pois este parâmetro condiciona todos os equilíbrios químicos que ocorrem durante o processo de fabrico da cerveja [5].

O malte, obtido da cevada através de um processo de maltagem, é um dos principais constituintes da cerveja. O processo de maltagem é efetuado com o intuito de converter o amido em açúcares fermentáveis pela levedura, uma vez que este processo

ativa as enzimas do malte responsáveis por essa conversão. A maltagem pode ser conduzida de diversas formas, dando origem a diferentes tipos de malte, o que por consequência, dará origem a diferentes tipos de cerveja [6].

Podem também ser utilizados grãos crus ou “*gritz*”, originários do milho ou do trigo, que ao contrário da cevada, não são sujeitos ao processo de maltagem. Outra das distinções em relação ao malte é o facto de o “*gritz*” não conter enzimas e ter um elevado teor de amido. De referir que este elevado teor de amido reduzirá a possibilidade de formação de precipitados na cerveja após a fermentação, reduzindo assim o aparecimento de turvação no produto final [6,7].

O lúpulo (*Humulus lupulus*), também conhecido como sendo o “tempero da cerveja” é outro importante constituinte da cerveja, uma vez que é o responsável pelo aroma e por conferir o amargor à cerveja. A esta planta, da família das *Cannabaceae*, está também associada outras contribuições, tal como o auxílio na formação e estabilização de espuma e ainda lhe são reconhecidas propriedades antissépticas e conservantes [5,6].

A levedura é o ingrediente responsável, em condições anaeróbias, pela transformação das matérias-primas em cerveja, devido à sua capacidade de converter açúcares em álcool e gás carbónico. As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem exclusivamente ao género *Saccharomyces*. São reconhecidos, essencialmente, dois tipos de leveduras: as responsáveis pela fermentação alta (*Saccharomyces cerevisiae*) e as responsáveis pela fermentação baixa (*Saccharomyces uvarum*) [5,8].

1.2.2. Processo Produtivo

A indústria cervejeira procura com os conhecimentos atualmente disponíveis condicionar ou estimular a produção de certos compostos com o objetivo de produzir uma bebida com características próprias, que agrade aos consumidores, com uma qualidade regular e que se mantenha, dentro do possível, inalterada ao longo do tempo.

Na figura 2 observa-se um esquema simples do complexo processo de produção de cerveja que será descrito seguidamente. Esta figura pretende apenas dar ênfase às principais etapas do processo produtivo.

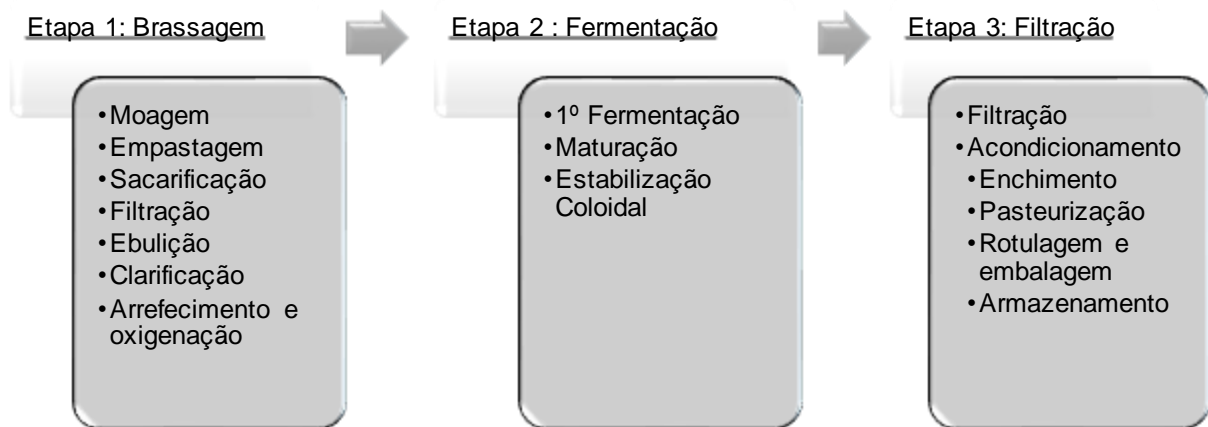


Figura 2: Processo de produção da cerveja.

O processo produtivo pode ser dividido em três etapas fundamentais: a brassagem, a fermentação e, por último, a filtração da cerveja.

A etapa de brassagem é uma etapa essencial uma vez que vai produzir os nutrientes essenciais para a fermentação. A sua composição é rica em açúcares, aminoácidos, vitaminas, iões inorgânicos e lípidos [5].

A brassagem pode ser dividida nas etapas de moagem do malte, empastagem do malte, caldas, sacarificação, filtração, ebulição, clarificação, arrefecimento e oxigenação do mosto. É durante esta etapa que se definem características finais do produto como a cor, o conteúdo alcoólico e o amargor [9].

Inicialmente o malte e o “gritz” são sujeitos a um processo de limpeza com o intuito de remover impurezas que possam ser prejudiciais ao processo, como é o caso dos metais. Após o processo de limpeza é efetuada a moagem do malte de forma a obter uma distribuição granulométrica que ajude à extração e favoreça a conversão dos constituintes do malte [9].

Segue-se a empastagem do malte que ocorre na caldeira de empastagem. Esta etapa possibilita a ocorrência de reações bioquímicas de desdobramento das moléculas mais complexas, como o amido e proteínas, em moléculas mais simples e solúveis, pela ação das enzimas do malte. A eficiência do processo de empastagem é de extrema importância para que seja possível obter um extrato com características adequadas para a produção de cerveja [6].

A sacarificação pode ser definida como a última etapa de degradação enzimática do mosto, ou seja, onde se garante que todo ou a maior parte do amido e compostos complexos foram degradados em moléculas mais simples. Durante todas estas

operações são mantidas sob controlo variáveis importantes, como pH, temperatura e tempo [9].

A ebulição do mosto tem como principal finalidade a solubilização dos compostos aromáticos e dos compostos responsáveis pelo amargor do lúpulo, que é adicionado nesta fase, a esterilização do mosto, a inativação das enzimas, a precipitação de substâncias prejudiciais, como é o caso de proteínas de elevado peso molecular, e, por último, a concentração do mosto.

A clarificação é a etapa responsável por tornar o mosto num líquido límpido, livre de matérias em suspensão, que iriam causar efeitos negativos na fermentação, dando características indesejáveis à cerveja.

Dado que a levedura necessita de oxigénio para que se inicie o seu crescimento, o mosto depois de arrefecido vai ser oxigenado. O controlo desta operação é fundamental para o processo, pois uma má condução da oxigenação pode originar problemas de aroma e sabor no produto final [6].

A correção do extrato, medido em termos de açúcares no mosto, também denominada de padronização do mosto é a fase final da etapa de fabricação do mosto e só se torna necessária no caso do extrato não se encontrar dentro dos limites previamente estipulados.

A fermentação é a etapa mais importante de todo o processo produtivo, pois é a fase em que o mosto é transformado em cerveja por ação da levedura. Na indústria, a adição de levedura ao mosto é designada por sementeira [9].

A fermentação pode então ser definida como o efeito cumulativo do crescimento da levedura no mosto, resultando no aparecimento da cerveja, isto é, a levedura vai consumindo os nutrientes do mosto, ocorrendo assim a sua multiplicação e crescimento, e através de reações biológicas vai dando origem ao produto desejado [8].

A quantidade de levedura a semear deve ser a mais precisa possível, para que sejam evitados problemas como autólises e contaminações das células de levedura, fermentações mal conduzidas, e a geração de aromas inconvenientes [9].

Durante a fermentação podemos identificar a ocorrência de quatro fases distintas. A primeira fase, denominada de fase “lag” ou de respiração, é a fase de adaptação da levedura ao meio. Esta é caracterizada pela propagação da levedura, consumo de todo o oxigénio do mosto e utilização das reservas da levedura como fonte

de energia, uma vez que a assimilação de açúcares do mosto é praticamente inexistente.

A fase que se segue é a fase de crescimento, caracterizada essencialmente pela multiplicação intensa das células de levedura. Nesta fase e nas fases posteriores, e uma vez que todo o oxigénio foi consumido, estamos em condições de anaerobiose. A terceira fase é conhecida como a fase de fermentação. Nesta fase as reações biológicas de consumo de açúcares do mosto dão origem ao álcool, ao dióxido de carbono e a outros produtos secundários responsáveis pelo aroma e gosto característicos da cerveja. A última fase, denominada de fase estacionária, ocorre quando já não existem açúcares fermentescíveis na cerveja e é caracterizada pela redução do metabolismo da levedura [8].

As etapas posteriores à fermentação são a maturação da cerveja seguida da estabilização coloidal da mesma, também designada por guarda, tendo como principais objetivos a deposição da levedura e outros precipitados e ainda a estabilização físico-química.

Durante o período de maturação da cerveja, e uma vez que ainda se encontra levedura no meio, ocorre a eliminação de compostos voláteis responsáveis pelos sabores indesejáveis na cerveja, tais como aldeídos e o diacetilo [10]. É também durante a maturação que ocorre a excreção de compostos da levedura que vão contribuir beneficemente para o corpo e características organoléticas da cerveja [6].

Com a diminuição da temperatura na etapa de maturação, a levedura sedimenta deposita-se na base das cubas de fermentação, sendo assim possível a sua recolha para posterior utilização. O processo de recolha deve ser efetuado o mais breve possível de modo a evitar a ocorrência de autólise.

A levedura recolhida é então armazenada e após algumas sementeiras vai-se degradando sendo, por isso, desprezada e substituída por uma levedura propagada a partir de uma cultura pura. Industrialmente a levedura é desprezada quando se encontra na sétima ou oitava geração [9].

A estabilização coloidal é alcançada pela eliminação de complexos formados pelas proteínas e taninos, que se vão precipitar em condições de baixas temperaturas. A presença destes compostos iria causar turvação no produto final.

A etapa de filtração ocorre antes da cerveja ser enviada para o enchimento. O objetivo essencial da filtração é o de remover por completo todas as substâncias que se encontram em suspensão na cerveja. Para além da remoção de substâncias em

suspensão, a etapa de filtração confere também à cerveja estabilidade biológica e química [6,9].

Todo o processo de clarificação da cerveja deve ser operado a baixas temperaturas, e deve-se evitar a entrada de oxigénio no processo, quer na filtração quer nas etapas a jusante. A entrada de oxigénio e a sua consequente dissolução na cerveja tem um efeito muito prejudicial, uma vez que provoca reações de oxidação com os seus componentes tornando o produto inadmissível para consumo [6].

Após a operação de clarificação, esta é encaminhada para os tanques de cerveja filtrada. Dos tanques de cerveja filtrada, a cerveja é conduzida para a zona de enchimento, onde este produto será acondicionado nas diversas formas em que se apresenta no mercado, isto é, em garrafa, lata ou em barril. No entanto, antes ou após o enchimento, é necessário proceder à pasteurização, conferindo assim estabilidade biológica ao produto final, pela eliminação de microrganismos patogénicos que nele possam existir. O produto final encontra-se então pronto para ser distribuído pelos diversos pontos de venda do país e do mundo [6,9].

1.3.Caracterização Sensorial da Cerveja

É difícil identificar todos os constituintes responsáveis pelo aroma e/ou gosto, ou seja, pelas características organoléticas da cerveja.

Ao longo dos anos têm sido caracterizadas várias vias de síntese química e bioquímica que levam à formação da maioria dos compostos capazes de estimular os recetores nervosos que se encontram nas cavidades bucal e nasal dos seres humanos e provocar as sensações que normalmente temos quando bebemos uma cerveja. Cerca de 800 compostos diferentes são atualmente conhecidos na cerveja, sendo o seu contributo para as características globais variável [11].



Figura 3: A roda dos aromas e sabores – *The Beer Flavour Wheel*, desenvolvido por Morten Meilgaard (Meilgaard 1970).

Tendo em conta que existe um variadíssimo número de tipos de cerveja, todas possuidoras de características particulares, como resultado da utilização de diferentes matérias-primas ou de diferentes processos de fabrico, a caracterização sensorial de uma cerveja obriga à utilização de um conjunto de descritores sensoriais gerais e próprios para este tipo de bebida.

O conjunto de descritores em questão foi compilado por Morten Meilgaard na década de 70 e ilustrada numa roda de aromas e sabores. Esta roda dos aromas e sabores foi posteriormente adotada e normalizada pelo EBC – *European Brewery Convention* –, pelo ASBC – *American Society of Brewing Chemists* –, e ainda pelo MBAA – *Master Brewers Association of the America* – como *The Flavor Wheel* (figura 3).

A roda dos aromas e sabores serve de instrumento para a caracterização do conjunto de sensações gustativas e olfativas que podem ser sentidas por qualquer provador de cerveja experiente [12].

1.3.1. Estabilidade Organolética da Cerveja

Um dos principais objetivos da indústria cervejeira é o de possuir um processo de fabrico que lhes permita obter uma cerveja sempre com os mesmos padrões de qualidade e com características inalteráveis ao longo do seu envelhecimento. No entanto os compostos químicos responsáveis por transmitir o gosto e o aroma não estão em total equilíbrio químico e muitas reações químicas ocorrem durante o armazenamento, resultando numa diminuição de notas de sabor fresco e na aparência de aromas e gostos característicos associados à cerveja envelhecida [13].

O termo *off-flavour* é utilizado para designar um aroma ou sabor indesejável que resulta da degradação química ou microbiológica de componentes do produto. A presença de um dado *off-flavour* num alimento ou bebida é geralmente evidenciada por uma alteração no aroma ou sabor do produto. Desta forma deteta-se a existência de um problema e surge a necessidade de identificar a sua origem, nomeadamente saber qual ou quais os compostos responsáveis pelo *off-flavour* e determinar o seu teor no produto [14].

A maioria dos compostos químicos responsáveis pelos *off-flavours* tem uma elevada atividade sensorial e são perceptíveis em níveis de concentração muito baixos. No entanto, representam um sério problema de qualidade do produto devido aos seus baixos limites de perceção sensorial² [14, 15]. Este facto representa um dos maiores desafios da análise química de *off-flavours*, devido à necessidade de detetar concentrações muito baixas desses compostos, na presença de outros cuja concentração na amostra é muito mais elevada [9].

Apesar dos instrumentos analíticos serem ferramentas úteis na deteção das propriedades físico-químicas da cerveja, estes instrumentos não apresentam a capacidade de avaliar a perceção humana e é neste contexto que a análise sensorial se mostra necessária e indispensável para o estudo e controle de qualidade da cerveja, visto que somente através dela é possível avaliar a intensidade de um aroma/gosto, a aceitação e também fornecer resultados plausíveis capazes de quantificar características sensoriais do produto [16].

² Concentração mínima do composto à qual é detetado na análise sensorial

1.4. Alterações Sensoriais Durante o Armazenamento

Como já foi anteriormente dito, o processo de envelhecimento da cerveja é um aspeto que tem preocupado a indústria cervejeira e tem sido objeto de forte investigação na procura de identificar os compostos que são preponderantes na estabilidade organolética da cerveja e os compostos resultantes do processo de envelhecimento que são responsáveis pelas alterações sensoriais detetadas na cerveja envelhecida [9,17].

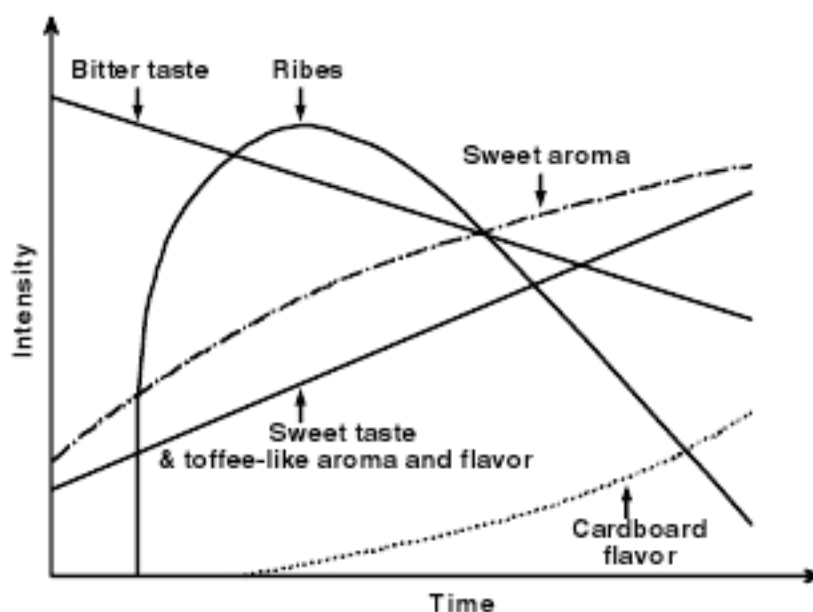


Figura 4: Diagrama de Dalgliesh - Representação esquemática das alterações sensoriais da cerveja ao longo do seu envelhecimento (Dalgliesh 1977).

Segundo o diagrama de *Charles Dalgliesh* (figura 4), estas alterações incluem uma diminuição da intensidade do amargor e um aumento da intensidade das características doce e caramelo/torrado de forma contínua ao longo todo o envelhecimento da cerveja, mas não é claro se estes são fenómenos independentes, como percebido pelos provadores especializados, ou então uma diminuição no amargor aparente percebido porque o aumento da doçura confunde o provador ou o inverso [18].

É preciso no entanto ter em atenção que o diagrama proposto por *Dalgliesh* constitui um modelo genérico das variações das características organoléticas que ocorrem ao longo do envelhecimento da cerveja e embora este comportamento seja atualmente o admitido pela indústria cervejeira, é evidente que nem todas as cervejas sofrem este tipo de alterações [19].

1.4.1. Fatores que Afetam as Alterações Sensoriais Durante o Armazenamento

Estudos sobre o impacto sensorial do envelhecimento da cerveja permitem reunir um conjunto apropriado de conhecimentos que possibilitem atuar adequadamente sobre os mecanismos de formação desses compostos, de forma a diminuir a sua influência sobre a estabilidade organolética da cerveja [14].

Como resultado desse esforço de investigação foram já caracterizados vários fatores associados ao fabrico e armazenamento da cerveja que influenciam de forma notória a qualidade e estabilidade deste produto. Neste contexto, surgem como exemplos de fatores relevantes: o tipo de cerveja, o teor oxigénio durante o fabrico e a sua concentração na cerveja, a temperatura e o tempo de armazenamento [16].

1.4.1.1. Influência do Teor de Oxigénio

Apesar dos mecanismos de envelhecimento da cerveja não terem sido totalmente elucidados, o teor de oxigénio presente durante o fabrico e o envelhecimento da cerveja é apontado como sendo um dos principais agentes responsáveis pela degradação das características organoléticas da mesma [20].

O oxigénio é, habitualmente, associado à diminuição do teor de antioxidantes e à promoção de reações radicalares responsáveis pelas alterações sensoriais da cerveja. Por estes motivos, têm sido recomendadas diversas estratégias que visam eliminar tanto quanto possível a presença do oxigénio nas diversas fases do fabrico [21,18].

Na realidade existem opiniões divergentes sobre esta temática porque, assim como muitos estudos afirmam que a diminuição do teor de oxigénio em todo o processo de fabrico é benéfico, existem aqueles que sugerem que a introdução de oxigénio é irrelevante no contexto de envelhecimento da cerveja [18].

Atualmente sabe-se que os níveis de oxigénio na embalagem final devem ser o mais baixo quanto possível e que a acumulação de oxigénio durante o enchimento deve também ser mínima [14]. Estudos realizados por *Bamforth* (1999a) mostraram que mesmo níveis de oxigénio tão baixos quanto 0,1 mg/L podem potenciar possíveis

problemas de estabilidade organolética. Há uma crescente convicção de que o oxigénio no colo da garrafa é consumido durante o armazenamento da cerveja embalada e de que quanto maior for o ar do colo da garrafa, maior será a taxa de deterioração da cerveja [18].

Estudos realizados por Gribsy *et al.* demonstram que amostras armazenadas a níveis elevados de oxigénio desenvolvem, de uma forma mais pronunciada o carácter oxidado, mas a mudança de sabor principal era a nota doce e caramelizada, bastante diferente do típico sabor papel cartão que geralmente é associado com o envelhecimento da cerveja oxidada [21].

Esta descoberta evidencia que para além dos compostos já conhecidos (ex. trans-2-nonenal) e associados ao envelhecimento por oxidação, existem outros compostos com limiares de perceção mais baixos mas que tem um impacto importante na estabilidade organolética da cerveja durante o envelhecimento [14,18].

1.4.1.2. Influência da Temperatura de Armazenamento

Além do teor de oxigénio, outro fator importante que afeta a estabilidade organolética da cerveja é a temperatura de armazenamento, neste sentido a conservação da cerveja após o seu fabrico é, igualmente, um aspeto que tem merecido a atenção da indústria cervejeira [14].

Nas fábricas, a cerveja produzida é armazenada em armazéns a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Sabe-se que o condicionamento da cerveja a temperaturas baixas atrasa todos os fenómenos associados ao seu envelhecimento, e que a proteção da cerveja da luz natural evita a ocorrência de fenómenos de foto-oxidação, associados ao desenvolvimento de sabores desagradáveis [18].

A temperatura de armazenamento afeta as muitas reações químicas envolvidas durante o processo de envelhecimento da cerveja, uma vez que o aumento da temperatura de armazenamento provoca um aumento na velocidade das reações químicas, que por sua vez dependem da energia de ativação da reação. Esta energia de ativação difere consoante o tipo de reação, o que significa que as taxas de reações não aumentam de forma igual para iguais incrementos de temperatura. Consequentemente, o armazenamento da cerveja em diferentes temperaturas não gera o mesmo aumento a nível dos compostos de envelhecimento [21].

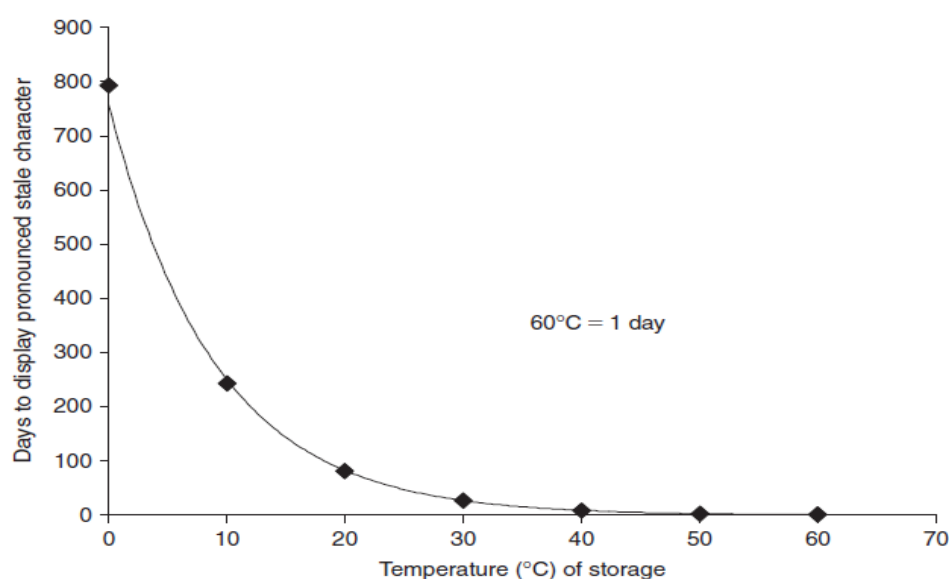


Figura 5: O impacto da temperatura na degradação sabor na cerveja (Bamforth2004).

Alguns estudos sensoriais referentes a estabilidade da cerveja durante o armazenamento e baseados na equação de *Arrhenius* revelam que a velocidade das reações químicas durante o armazenamento sofre um aumento de duas a três vezes para cada aumento de 10°C da temperatura. Estudos realizados por *Bamforth* (figura 5) demonstram que uma cerveja ao fim de 100 dias a 20°C desenvolve notas características associadas da cerveja envelhecida, da mesma forma que uma cerveja submetida a 30°C durante um mês ou a 60°C durante um dia [11,20].

2. Compostos Voláteis Estudados

Como referido anteriormente, as alterações sensoriais da cerveja são o resultado tanto do aumento como da diminuição do teor de compostos detetáveis e por mudanças nos níveis de substâncias que podem mascarar ou potenciar a deteção de outros compostos químicos com limiares de perceção mais baixos [16].

Existe, no entanto, uma diferença entre a perceção do aroma/gosto quando a cerveja é envelhecida "naturalmente" e a cerveja que tenha sofrido um processo de envelhecimento "forçado", sendo que uma cerveja envelhecida a 25°C desenvolve notas características a caramelo, enquanto a 30°C ou 37°C as notas de papel-cartão são predominantes [11].

Uma variedade de compostos aromatizantes pode surgir, dependendo do tipo de cerveja, das condições de fabrico e armazenamento. Estes compostos são usualmente referidos como "marcadores químicos de envelhecimento" e poderiam ser usados para monitorização da cerveja durante o envelhecimento. Neste contexto surgem como exemplos alguns compostos voláteis tais como (fenilacetaldeído, etilfenilacetato, feniletilacetato e 2-feniletanol) apontados como sendo responsáveis pelo desenvolvimento de "*off-flavours*" associados ao aroma e ao sabor doce [14].

2.1. Fenilacetaldéido

O fenilacetaldéido é um composto aromático volátil que resulta da degradação de *Strecker* da fenilalanina [22]. É caracterizado por um odor característico a mel e flores [23].

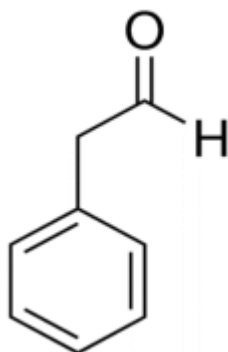


Figura 6: Fórmula de estrutura do fenilacetaldéido.

A degradação de *Strecker* acontece por reação dos compostos carboxílicos gerados nas reações de *Maillard* a partir de açúcares com aminoácidos [24].

Na literatura são descritas duas vias que conduzem a formação de fenilacetaldéido [22]. Uma é através da descarboxilação de L-feniletilamina, seguida por oxidação de amina e a segunda é através de desaminação de L-fenilalanina em fenilpiruvato seguido pela sua descarboxilação em fenilacetaldéido [22,25-27].

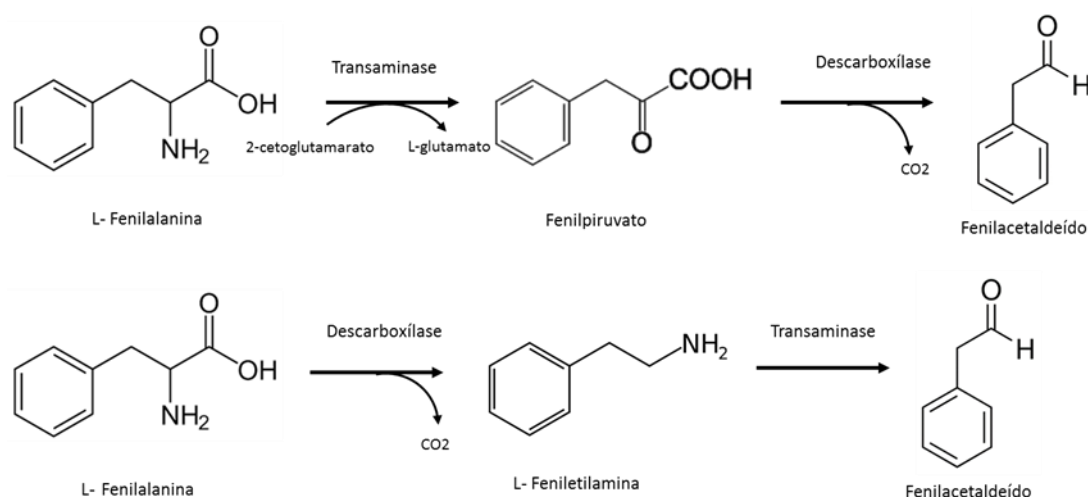


Figura 7: Produção de fenilacetaldéido a partir da L-fenilalanina pela síntese de Ehrlich (Kamigana et al. 2006).

Na cerveja, a biossíntese de formação do fenilacetaldeído (figura 7) pela *Saccharomyces cerevisiae* acontece através da via de *Ehrlich*, através do catabolismo de aminoácidos. Isto envolve transaminação de fenilalanina para fenilpiruvato seguido por descarboxilação [22,26]. As principais propriedades físico-químicas do fenilacetaldeído são indicadas na tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do fenilacetaldeído

Propriedade	Descrição
Formula	C ₈ H ₈ O
Nome IUPAC	2-fenilacetaldeído
CAS	122-78-1
Ponto de ebulição	195 °C
Massas molecular	120,15 g/mol
Densidade a 20°C	1,079 g/mL
Limiar de Percepção	1 µg/L
Índice de refração a 20°C	1,526

2.2. 2-Feniletanol

Os álcoois superiores são um dos metabolitos produzidos durante a fermentação por leveduras, podendo ser considerados como o maior grupo de compostos aromáticos formados. A sua presença é essencial para a qualidade do aroma final da cerveja pois são responsáveis pelas notas florais e frutadas do aroma [27].

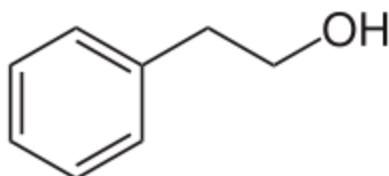


Figura 8: Fórmula de estrutura do 2-feniletanol.

De entre os álcoois superiores formados durante o processo de fermentação, o 2-feniletanol é um álcool superior que possui um aroma característico a pétalas de rosas [27,28]. É utilizado pela indústria de perfumes e fragâncias e também pela indústria alimentar. Pode ser obtido através de extratos naturais de muitas flores, por síntese química.

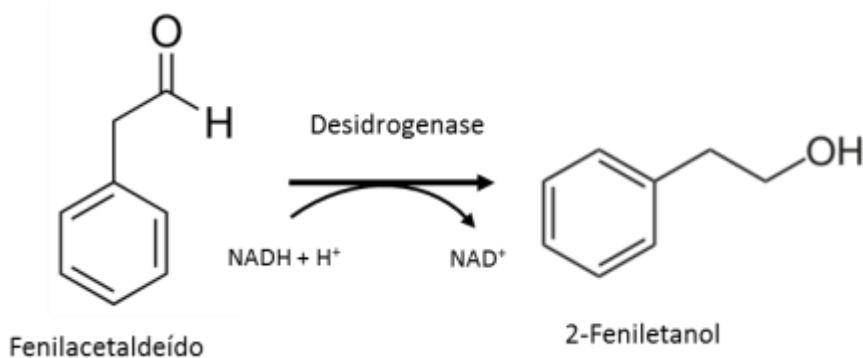


Figura 9: Produção de 2-feniletanol a partir do fenilacetaldeído (Etschmann et al. 2002).

As leveduras são consideradas ótimas produtoras de 2-feniletanol tanto através do catabolismo dos açúcares ou através da bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol [27]. O primeiro é a síntese do álcool através da L-fenilalanina em fenilpiruvato a partir de hidratos de carbono. A última é um mecanismo de *Ehrlich*, em que a L-fenilalanina é degradada em álcool por meio de desamidação e descarboxilação [27,29].

Na cerveja as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (utilizadas no processo produtivo para a fermentação do mosto) catalisam a bioconservação de L-fenilalanina em 2-feniletanol (figura 9) [27].

O 2-feniletanol possui um forte impacto no aroma final da cerveja e normalmente a sua presença em concentrações elevadas inibe a atividade do sabor do DMS [28].

Este composto pode ser detetado pelo olfato humano em concentrações de 12 a 24 ng/L no ar e 1000 µg/L em solução aquosa [27]. Na tabela 3 são indicadas as propriedades físico químicas do 2-fenieletanol.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do 2-feniletanol

Propriedade	Descrição
Formula	C ₈ H ₁₀ O
Nome IUPAC	2-feniletanol
CAS	60-12-8
Ponto de ebulição (101,3 KPa)	219,8°C
Ponto de fusão	-27°C
Massa molecular	122,0 g/mol
Densidade a 20°C	1,0202 g/mL
Índice de refração a 20°C	1,5325
Limiar de Percepção	1000 µg/L
Solubilidade	19g/L em água a 20°C, solúvel em álcoois, ésteres, aldeídos, benzil benzoato, óleo mineral

2.3. Feniletilacetato

Assim como os álcoois superiores, os ésteres voláteis são formados como subproduto durante a fermentação primária para a produção de cerveja e representam um dos grupos mais importantes, responsáveis pela formação de compostos aromáticos [28,30].

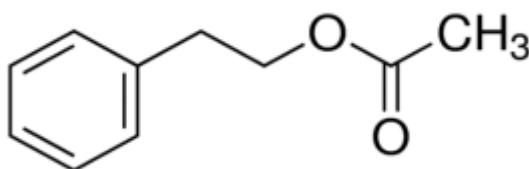


Figura 10: Fórmula de estrutura do feniletilacetato.

Os ésteres voláteis desempenham um papel considerável nas características organoléticas da cerveja pois são responsáveis pelos aromas e sabores frutados [30,31]. A maioria dos ésteres está presente em concentrações próximas do limiar de percepção e pequenas alterações na sua concentração pode ter um grande efeito sobre as características organoléticas da cerveja [32].

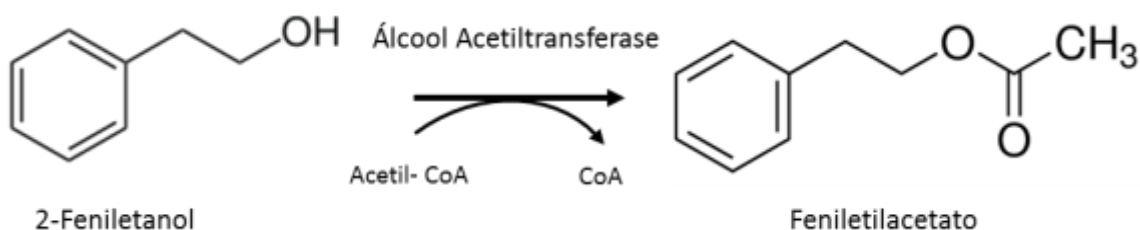


Figura 11: Produção de 2- feniletilacetato a partir do 2-feniletanol (Etschmann et al. 2005).

O feniletilacetato é um éster volátil que possui um aroma característico a mel e adocicado e apresenta-se como sendo um líquido transparente e incolor. Geralmente, é usado em perfumes e cosméticos, mas também pode ser adicionado para conferir sabor aos alimentos e bebidas [28,33]. As suas características gerais estão indicadas na tabela 4.

Na cerveja o fenilacetaldeído pode ser formado pelas leveduras durante a fermentação, através da esterificação do etanol ou de um álcool superior e um éster gordo de acetil-CoA (figura 11) [34].

Tabela 4: Propriedades físico-químicas do fenil etilacetato

Propriedade	Descrição
Formula	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Nome IUPAC	2-Fenil.etilacetato
CAS	103-45-7
Ponto de ebulição	238 - 239 °C
Massa molecular	164,20 g/mol
Densidade a 20°C	1,032 g/mL
Índice de refração a 20°C	1,497-1,499
Limiar de Perceção	250 µg/L
Solubilidade	Água, etano, éter e outros solventes orgânicos

2.4. Etilfenilacetato

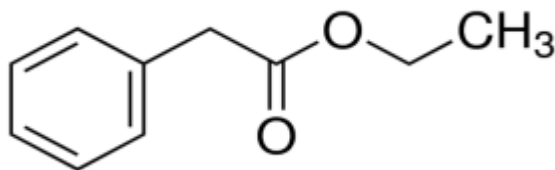


Figura 12: Fórmula de estrutura do etilfenilacetato.

O etilfenilacetato é um líquido transparente incolor, com aroma frutado e a rosas [35]. É amplamente utilizado na indústria alimentar e na indústria de cosméticos [36]. As suas características físico-químicas encontram-se indicadas na tabela 5.

Normalmente a produção de etilfenilacetato é realizada por síntese química. O método de síntese química consiste na mistura do ácido fenilacético e do etanol em ácido sulfúrico concentrado. O etilfenilacetato pode também ser obtido através da extração de óleo essencial ou por meio de biotransformação. As vias biossintéticas que conduzem à formação deste éster são bastante comuns em plantas e microrganismos.

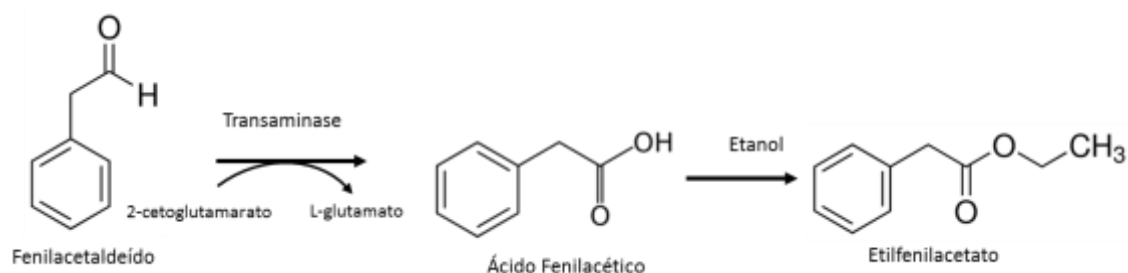


Figura 13: Produção de etilfenilacetato a partir do fenilacetaldeído (Xuan Tian et al. 2015).

Na cerveja, o etilfenilacetato é produzido pela levedura durante a fermentação alcoólica por esterificação de ácido fenilacético a partir de precursores fenólicos.

As leveduras através da síntese de *Ehrlich* transformam a L-fenilalanina em fenilacetaldeído por transaminação e descarboxilação. E, em seguida, o ácido fenilacético é gerado pela função de NAD (P) + aldeído desidrogenase. A reação de esterificação do ácido acético e do etanol formam o etilfenilacetato. A formação do etilfenilacetato também pode ocorrer após o acondicionamento, como resultado de reações não enzimáticas [37].

Tabela 5: Propriedades físico-químicas do etilfenilacetato

Propriedade	Descrição
Formula	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Nome IUPAC	etil-2-fenilacetato
CAS	101-97-3
Ponto de ebulição	229 °C
Massa molecular	164,20 g/mol
Densidade a 20°C	1,032 g/mL
Índice de refração a 20°C	1,497-1,499
Limiar de Perceção	250 µg/L
Solubilidade	Água, etano, éter e outros solventes orgânicos

Objetivos do Trabalho

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o impacto de alguns compostos voláteis, como fenilacetaldéido, etilfenilacetato e feniletilacetato sobre a estabilidade organolética da cerveja, enquanto possíveis indicadores químicos do processo de envelhecimento.

Os objetivos mais específicos deste trabalho foram:

- A identificação e caracterização dos compostos químicos responsáveis pelo “*off-flavour*” da cerveja, particularmente os responsáveis pelo aroma/gosto doce;
- Avaliação do impacto sensorial desses compostos;
- O estudo dos fatores industriais envolvidos no aparecimento destes compostos e a identificação de fatores críticos do processo industrial, associados ao desenvolvimento desses “*off-flavours*” indesejados na cerveja.

3. Procedimento Experimental

3.1. Caracterização da Amostra

3.2. Identificação de Voláteis

3.2.1. Plano de Amostragem

3.2.2. Materiais e Equipamentos

3.2.3. Reagentes

3.2.4. Preparação de soluções padrão

3.2.5. Descrição do método de análise

3.2.5.1. Técnica de Extração

3.2.5.2. Condições Cromatográficas (GC-MS)

3.3. Análise Sensorial

3.4. Análise Estatística

3.1. Caracterização da Amostra

As amostras de cervejas foram analisadas no tempo inicial. Os níveis de SO₂ total, de CO₂ e de Fenilalanina foram determinados. Estas análises foram realizadas por um laboratório independente. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Níveis de SO₂ Total, de CO₂ e de Fenilalanina dos lotes de cervejas analisados.

Lote	SO ₂ Total (mg/L)	CO ₂ (g/L)	Fenilalanina (mg/L)
A	5	5,3	26
B	8	5,3	8
C	8	4,9	13,5
D	6	5,2	14
E	9	4,9	26

Na indústria cervejeira, o Dióxido de sódio, assume um papel importante na estabilidade organolética devido à ação antioxidante, na medida em que reage com o oxigénio e radicais livres, atrasando a evolução oxidativa. O nível de SO₂ produzido pela levedura varia, em geral entre 2-9 mg/L, sendo inferior ao teor máximo legalmente permitido na cerveja.

O interesse na determinação do teor de SO₂ na cerveja resulta, por um lado da existência de legislação que estabelece os valores máximos autorizados e, por outro lado, do interesse em monitorizar o desaparecimento do SO₂ durante o armazenamento da cerveja, já que este composto desaparece com o armazenamento, e correlacioná-lo com a estabilidade organolética da bebida.

3.2. Identificação de Voláteis

A complexidade dos equilíbrios em que o fenilacetaldéido, o etilfenilacetato e o feniletilacetato participam na cerveja e os baixos níveis encontrados, dificultam a sua quantificação rigorosa. A importância de quantificar estes compostos voláteis resulta de esse valor permitir estabelecer uma correlação com as características organoléticas da cerveja e permitir prever o perfil da evolução deste composto em condições normais de armazenamento e avaliar também quais os fatores industriais envolvidos no seu aparecimento. Assim, será possível inferir sobre um período de validade seguro sem que tal defeito organolético seja detetado pelo consumidor.

3.2.1. Plano de Amostragem

Neste estudo foram analisados cinco lotes de cerveja Super Bock, produzidas pela UNICER - Bebidas de Portugal SGPS, SA de acordo com os padrões *standard* correspondentes a cerveja comercial do tipo *Lager*. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Tabela 7: Plano de amostragem para o estudo dos compostos voláteis durante o período de armazenamento

Lote	Mês		janeiro	fevereiro	março	abril	maio	junho	julho
	Condições do ensaio								
A B C D E	4°C					O ₂			O ₂
	20°C				O ₂			O ₂	
	37°C	3 dias							
		5 dias							
		7 dias			O ₂				
		14 dias							

Para se avaliar o impacto da temperatura e do tempo de armazenamento no aparecimento de compostos voláteis responsáveis pelos “*off-flavour*”, característicos do aroma e sabor doce na cerveja, as amostras foram colocadas em diferentes condições (tabela 7):

- I. As amostras armazenadas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ foram utilizadas como controlo e foi sendo feita uma motorização ao longo do tempo de armazenamento.
- II. Como forma de promover a degradação do aroma/gosto e o aparecimento desses compostos, as amostras foram submetidas a um processo de envelhecimento forçado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3, 5, 7 e 14 dias.
- III. De modo a analisar a evolução da concentração dos marcadores químicos de envelhecimento ao longo do tempo, as amostras foram colocadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (processo de envelhecimento natural) sendo realizados ensaios mensais durante 6 meses.

O estudo do impacto do oxigénio durante o processo de armazenamento foi investigado através da introdução de oxigénio atmosférico (O₂) no colo da garrafa. Essa introdução de oxigénio foi realizada deixando as amostras em contacto com o oxigénio atmosférico durante sensivelmente 5 minutos. De seguida as garrafas foram novamente encapsuladas e procedeu-se a uma agitação uniforme para que o oxigénio presente no

colo se dissolvesse na amostra. As amostras com oxigénio foram então armazenadas durante 7 e 14 dias (a 37°C) e durante 3 semanas e 3 meses (a 4°C e 20°C).

3.2.2. Materiais e Equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados para a realização do trabalho experimental foram os seguintes:

- Micropipetas *Brand Transferpette* (2 – 20 µL; 20 – 100 µL), *sartorius Proline Plus* (P200 – capacidade máxima de 200 µL; P1000 - capacidade máxima de 1000 µL);
- Pipeta volumétrica de vidro para medição de volumes de 5 mL;
- Funil de extração (capacidade máxima de 100 mL);
- Goblé de vidro (10, 20 e 50 mL);
- Balões volumétricos (10 e 25 mL) para a preparação de soluções padrão;
- Vidros de relógio;
- Microtubos de 2 mL;
- Vials de 300 µL;
- Insert Supelco (0,25 mL);
- Proveta (50 mL);
- Espátulas;
- Pipeta de aspiração;
- Suporte universal;
- Balança de precisão *Mettler*, modelo PE2000;
- GC-MS Thermo Scientific- Model Trace 1300
- Auto sampler modelo AI 1310
- Coluna capilar *Thermo Scientific* (60 m x 25 mm x 0,25 l)
- *Xcalibur software Version 1.4 (Thermo Electron Corporation, USA)*

3.2.3. Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação das soluções utilizadas ao longo do trabalho e as suas características gerais estão indicadas na tabela 8:

Tabela 8: Reagentes utilizados na preparação das soluções utilizadas

Reagente	Fórmula Molecular	Nº CAS	Marca	Grau de Pureza
Diclorometano (para análise de dioxinas, furanos e PCB)	CH_2Cl_2	75-09-2	<i>Fluka</i>	99,8%
Sulfato de Sódio Anidro	Na_2SO_4	7757-82-6	<i>Sigma-Aldrich</i>	99%
3-Octanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$	589-98-0	<i>Fluka</i>	100%
Fenilacetaldéido	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CHO}$	122-78-1	<i>Sigma-Aldrich</i>	95%
2-Feniletilacetato	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	103-45-7	<i>Aldrich</i>	99%
Etilfenilacetato	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	101-97-3	<i>Sigma-Aldrich</i>	98%
2-Feniletanol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	60-12-8	<i>Aldrich</i>	99%

3.2.4. Preparação de soluções padrão

As soluções padrão do etilfenilacetato, do feniletilacetato e do fenilacetaldéido foram preparadas a partir de uma solução stock de 1000ppm a partir da qual foi preparada uma solução intermédia de 100 ppm. A partir da solução intermédia foram preparadas as soluções padrão nas concentrações descritas na tabela 9. Todas as soluções foram preparadas em diclorometano para análise em GC-MS.

O 3-octanol foi utilizado como padrão interno como forma de minimizar as interferências de sinal e os possíveis erros de preparação das amostras.

Tabela 9: Concentração das soluções padrão e volumes pipetados

Composto	Concentração (ppm)	Volume pipetado (μL)	Volume final (mL)	Volume μL 3-Oct (460 ppm)
Fenilacetaldéido (100 ppm)	1	10	10	50
	25	250	10	50
	50	500	10	50
	75	750	10	50
	100	1000	10	50
Feniletilacetato (100 ppm)	1	10	10	50
	25	250	10	50
	50	500	10	50
	75	750	10	50
	100	1000	10	50
Etilfenilacetato (100 ppm)	1	10	10	50
	25	250	10	50
	50	500	10	50
	75	750	10	50
	100	1000	10	50
2-Feniletanol (1x 10 ⁶ ppm)	500	5	10	50
	1000	10	10	50
	1500	15	10	50
	2000	20	10	50
	2500	25	10	50

Após a preparação das soluções padrão, estas foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) e através da razão massa/carga (m/z) foi possível identificar o composto, calcular a área do respetivo pico cromatográfico e efetuar as respetivas curvas de calibração (*anexo 1*).

3.2.5. Descrição do método de análise

Ao longo dos últimos anos vários métodos analíticos de extração/concentração têm sido utilizados para a análise de compostos voláteis em cerveja.

O procedimento experimental seguido neste estudo para a extração e quantificação de compostos voláteis foi baseado no trabalho de Soares da Costa. *et al.* 2004 [22].

O método baseia-se na solubilidade relativa dos analitos em duas fases líquidas imiscíveis. Após a extração os compostos voláteis foram identificados por GC-MS de

forma a poder-se correlacionar o teor de voláteis com o perfil sensorial da cerveja nas diferentes condições de armazenamento estudadas.

3.2.5.1. Técnica de Extração

Com base no trabalho desenvolvido por Soares da Costa. *et al.* 2004 [22] e tendo em conta o ponto de vista prático dos ensaios a realizar, optou-se por se utilizar a técnica de extração líquido-líquido. A figura 14 ilustra o procedimento experimental realizado.

Para a quantificação dos compostos voláteis analisados adicionou-se a 50mL de cerveja 50µL de 3-octanol (460ppm) e 5g de sulfato de sódio anidro. O 3-octanol foi utilizado, neste protocolo, como padrão interno.

A extração foi realizada com 10ml de diclorometano (CH_2Cl_2), em seguida foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro de forma a eliminar a água presente na fase orgânica e evitar interferência na análise por GC. Dos 10mL da fase orgânica extraída retirou-se 2mL para concentração com fluxo de azoto (200µL). As extrações foram realizadas em duplicado.

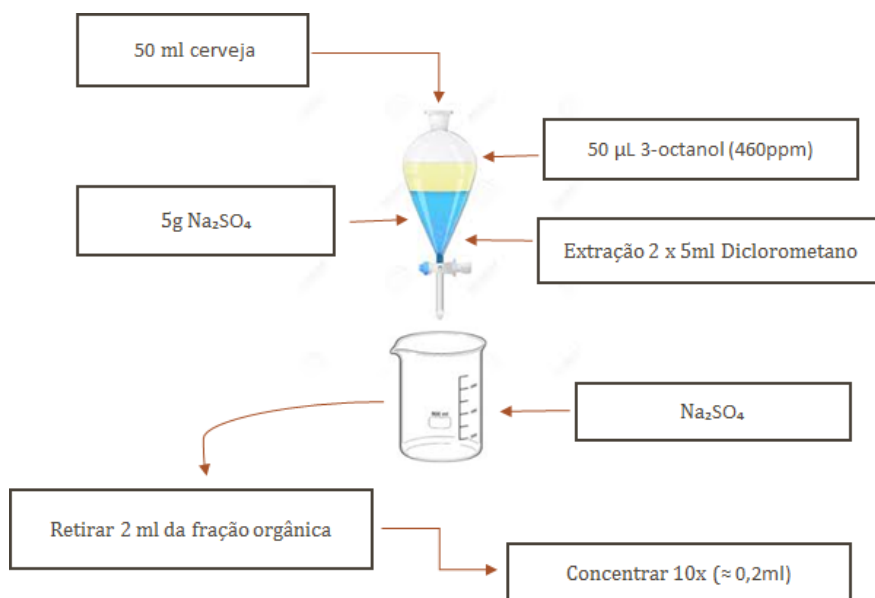


Figura 14: Ilustração do procedimento experimental realizado.

3.2.5.2. Condições Cromatográficas (GC-MS)

Após a otimização das condições do ensaio, as amostras foram analisadas por GC-MS. O GC-MS tem sido extensivamente utilizado para identificar e quantificar os componentes responsáveis pelas características organoléticas de vários géneros alimentícios, incluindo cerveja.

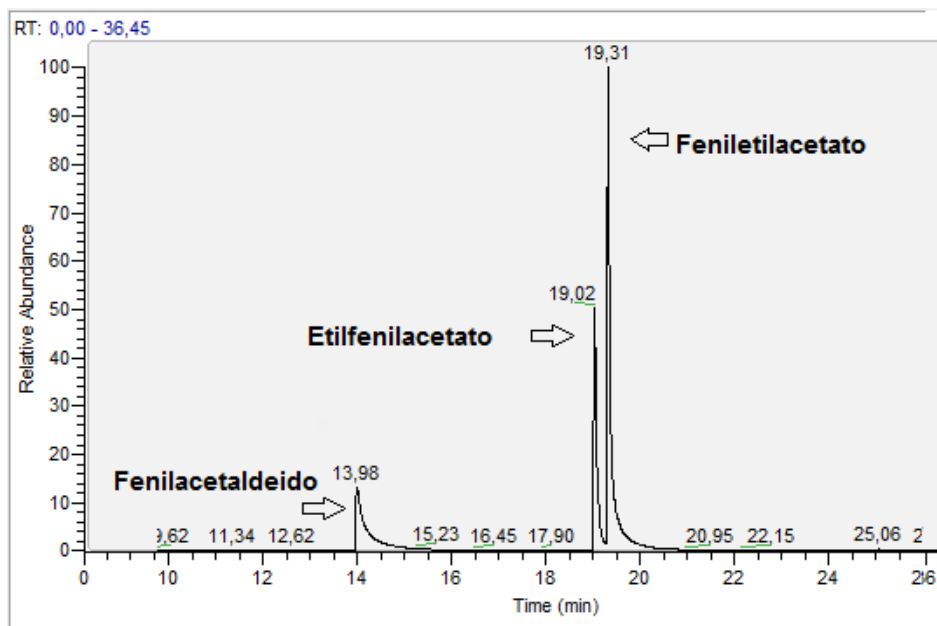


Figura 15: Exemplo de um cromatograma com a identificação dos padrões analisados e os tempos de retenção.

A identificação dos compostos voláteis em estudo foi efetuada num cromatógrafo *Thermo Scientific*- Modelo Trace 1300 equipado com detetor de massa modelo ISQ e auto sample modelo AI 1310 utilizando uma coluna capilar de 60 m x 25 mm x 0,25 l com fase ligada TQMS, sendo a temperatura inicial de 50°C por 2 minutos e gradiente de 6°C por minutos até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, conforme ilustrado na figura 16.

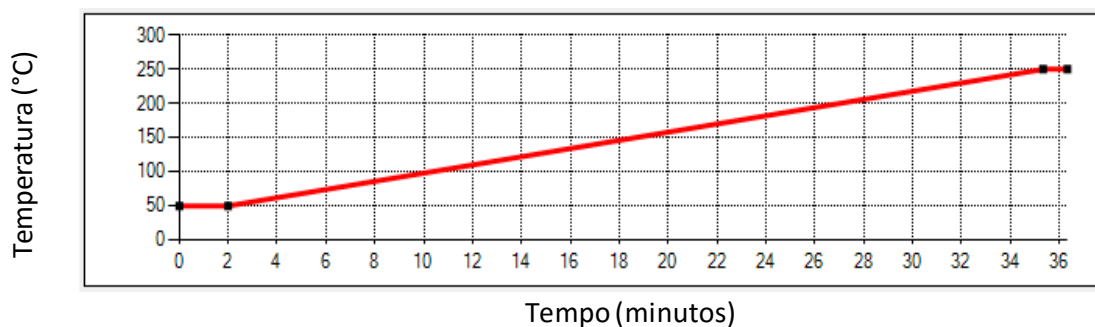


Figura 16: Ilustração do gradiente de temperatura utilizado na análise por GC-MS.

A temperatura inicial do injetor foi de 350°C e o caudal de injeção Split foi de 75mL por minuto. O gás de arraste foi o Hélio (He) com um caudal volumétrico constante de 1,5mL por minuto. Os espectros de massa foram obtidos com base na razão massa carga (m/z) e nos tempos de retenção, de acordo com a tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros de análise por GC-MS. A negrito são indicados os m/z principais.

Composto	lões m/z	Tempo de retenção (min)	Aroma Característico	Limiar de perceção
Fenilacetaldeído	91,120	13-14	Mel, Doce, Maçã Verde	
Feniletilacetato	91,104	19-20	Frutado, Adocicado, Floral	
Etilfenilacetato	91,164	19-20	Frutado, Solvente (verde)	
2-Feniletanol	91,92,122	15-16	Mel, Floral (rosas)	
3-Octanol	59,55,83	12-13	Usado como padrão interno	

3.3. Análise Sensorial

Em paralelo com as análises físico-químicas foram também realizadas análises sensoriais. Utilizou-se um painel composto por provadores treinados e as provas foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da empresa UNICER - Bebidas de Portugal SGPS, SA, em Leça do Balio.

Analisou-se a estabilidade organolética dos cinco lotes de cerveja, para as diferentes condições testadas. Pretende-se desta forma estudar o impacto sensorial destes compostos na cerveja durante o período de armazenamento. O planeamento para a realização das provas de análise sensorial é indicado na tabela 11.

Tabela 11: Plano de trabalho para a realização das provas de análise sensorial

Lote	Mês		janeiro	fevereiro	março	abril	maio	junho	julho
	Condições do ensaio								
A B C D E	4°C								
	20°C								
	37°C	3 dias							
		5 dias							
		7 dias							
		14 dias							

Logo após a abertura, foi apresentado a cada provador as cinco amostras de cervejas devidamente codificadas e de seguida foi-lhes pedido que avaliassem a estabilidade organolética de cada cerveja (anexo 2), numa escala de 9 (produto de ótima qualidade) a 1 (com defeitos tão graves que requerem ação imediata). Para as cervejas que obtiveram uma classificação negativa (de 1 a 5) foram utilizados alguns descritores (doce, aguado, frutado) para descrever os defeitos detetados.

Os testes foram realizados individualmente, em uma sala com temperatura controlada.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos pela análise sensorial e pela análise cromatográfica foram analisados por diferentes testes estatísticos de análise multivariável: análise de componentes principais (PCA) e regressão linear múltipla (MLR).

PCA é essencialmente um método descritivo. Este método é, normalmente, o primeiro passo no tratamento estatístico dos dados, pois permite que os principais aspetos variáveis de um conjunto de dados possam ser visualizados, sem o constrangimento de uma hipótese inicial referente a relação dentro das amostras e/ou entre as amostras e as respostas.

O objetivo principal deste método é encontrar uma correlação entre os diferentes parâmetros (objetos e variáveis) e detetar uma possível relação entre os objetos e/ou variáveis. Para encontrar as principais fontes de variabilidade de dados e a relação dentro ou entre objetos e variáveis, a matriz inicial [definida com $X(n,m)$] é convertida em uma matriz de objetos (amostras), em uma matriz de variáveis (dados químicos e sensoriais, neste caso) e em uma matriz erro (que representa a variação não

contabilizada pela extração do componente principal). Esta análise é dada pela seguinte equação:

$$\text{Equação 1: } \mathbf{X}_{(n,m)} = \mathbf{T}_{(n,k)} \mathbf{P}_{(k,m)}^T + \mathbf{E}_{(n,m)}$$

onde \mathbf{T} é a matriz de classificação, \mathbf{P} é a matriz de capacidade, \mathbf{E} é a matriz erro, n é o número de objetos (amostras de cerveja), m é o número de variáveis (neste estudo, parâmetros químicos e sensoriais avaliados), e k é o número de componentes principais [38].

O objetivo principal da MLR é estudar a relação entre a variável dependente (Y) e as outras variáveis independentes (X_n). A função matemática geral é uma equação de primeiro grau, traduzida por:

$$\text{Equação 2: } Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_m X_m + \varepsilon$$

onde X_m representa as m variáveis experimentais testadas, α é o termo constante e ε o erro de previsão. Os β_m são os coeficientes de regressão das variáveis independentes, e cada um representa o "peso" (correlação) da variável independente respetiva [39].

Para medir o grau de relação entre variáveis estudadas, os dois coeficientes mais utilizados foram calculados.

O coeficiente de correlação de *Pearson* (r) requer que ambas as variáveis sejam mensuráveis em um intervalo ou numa escala de razão e o seu cálculo é baseado em valores reais. O coeficiente de correlação de *Pearson* pode fornecer uma melhor estimativa sobre o coeficiente de correlação da população se os dados tiverem uma distribuição normal. No entanto esta correlação possui duas limitações: não é nem robusta nem estável. Não é robusta porque uma forte, porém não linear, relação entre as variáveis pode não ser identificada. Não é estável visto que pode ser extremamente sensível a um ou mais pontos médios periféricos.

O coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ) é um teste estatístico não paramétrico e só pode ser usado quando os dados tenham desobedecido os pressupostos paramétricos e/ou as suposições de distribuição. O coeficiente de classificação de *Spearman* requer que pelo menos os dados sejam ordenáveis e que o cálculo, que é igual ao coeficiente de correlação de *Pearson*, seja realizado mediante a classificação de todos os dados. Cada variável é classificada separadamente pondo os valores das variáveis por ordem e numerando-as [40].

O pacote estatístico *StatBox 7.5* (Agro Solutions, Paris, França) foi utilizado para todos os cálculos estatísticos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Influência das condições de armazenamento na estabilidade organolética da cerveja

4.1.1 Armazenamento a 4°C

4.1.2 Armazenamento a 20°C

4.1.3 Armazenamento a 37°C

4.2. Análise Cromatográfica

4.2.1. Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do feniletilacetato

4.2.2. Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do fenilacetaldeído

4.2.3. Influência do teor de oxigénio na concentração do feniletilacetato

4.2.4. Influência do teor de oxigénio na concentração do fenilacetaldeído

4.3. Análise Estatística

4.3.1. Análise Sensorial versus Análise Cromatográfica

4.1. Influência das condições de armazenamento na estabilidade organolética da cerveja

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos na análise sensorial dos diferentes lotes de cerveja armazenados a 4°C, 20°C e 37°C. Este estudo teve como objetivo analisar a influência da temperatura e do tempo de armazenamento na estabilidade organolética da cerveja.

A avaliação sensorial foi realizada utilizando uma escala que variava entre 9 (produto de ótima qualidade) e 1 (com defeitos tão graves que requerem ação imediata). Um resultado superior a 6 é considerado satisfatório, entre 5 e 4 não suficientemente satisfatório, entre 4 e 3 com defeitos dentro de um limite aceitável e inferior a 3 não satisfatório.

4.1.1. Armazenamento a 4°C

Os resultados obtidos na análise sensorial das cervejas mantidas a 4°C são apresentados na figura 17.

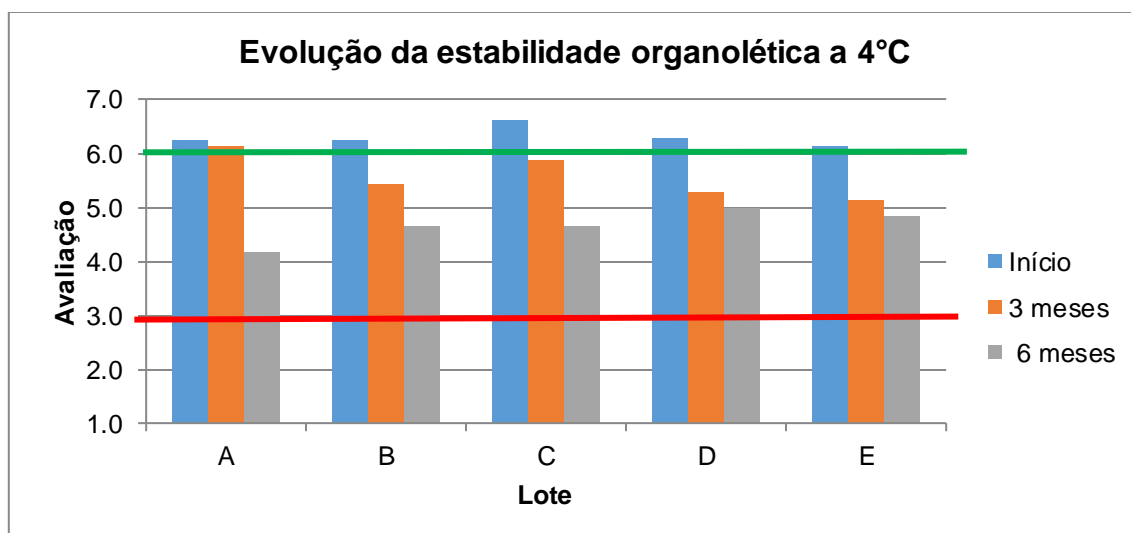


Figura 17: Representação gráfica da evolução da estabilidade organolética a 4°C.

Os resultados apresentados indicam que, apesar de se verificar uma diminuição da avaliação das cervejas armazenadas a 4°C, o painel considera que as cervejas armazenadas a esta temperatura mantêm-se estáveis ao longo do tempo, não sofrendo alterações perceptíveis a nível sensorial (a avaliação mantém-se dentro do intervalo considerado satisfatório). No entanto é possível verificar que o painel consegue

distinguir claramente uma cerveja fresca (no início do armazenamento) de uma cerveja que foi armazenada a 4°C durante 6 meses.

De um modo geral, verifica-se que no início, todas as cervejas são avaliadas de forma positiva e consideradas satisfatórias (resultado entre 6 e 7). Ao longo do tempo de armazenamento a 4°C a avaliação passa de 6-7 (satisfatória) para aproximadamente 4-5 (não suficientemente satisfatório). O painel considera que apesar de ocorrer uma perda de qualidade ao longo do tempo de armazenamento, esta não se revela significativa ao ponto de conduzir ao aparecimento de defeitos sensoriais que levem a rejeição das cervejas.

Estes resultados podem ser explicados pela própria temperatura de armazenamento que faz com que as alterações oxidativas e enzimáticas, que ocorrem na cerveja armazenada a temperaturas mais altas, sejam retardadas ou inibidas.

4.1.2. Armazenamento a 20°C

Observando a representação gráfica dos resultados obtidos da evolução da estabilidade organolética a 20°C, apresentados na figura 18, verifica-se claramente um decréscimo da qualidade organolética das cervejas ao longo do tempo de armazenamento a 20°C durante 6 meses.

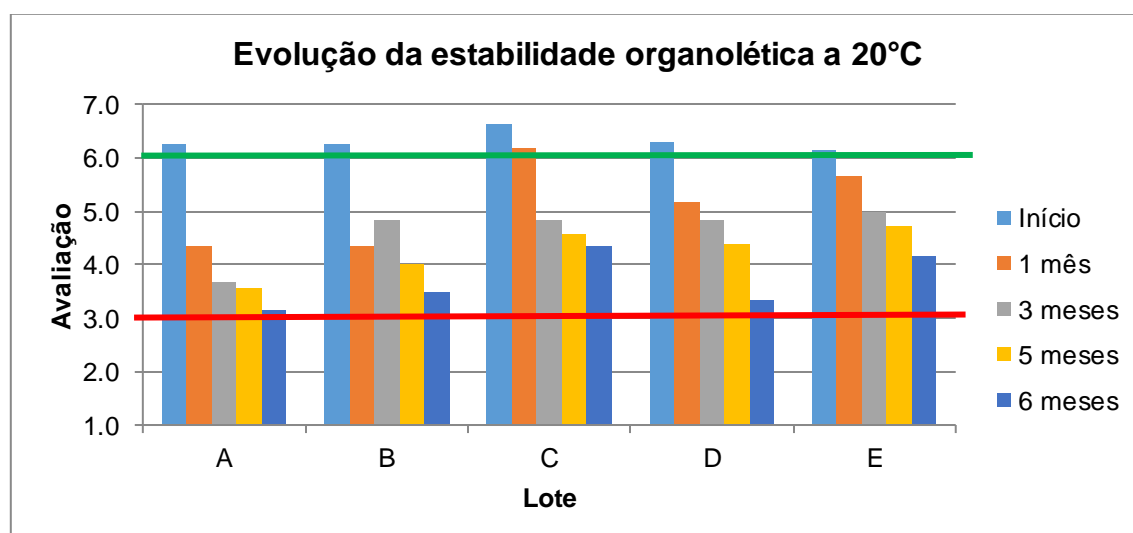


Figura 18: Representação gráfica da evolução da estabilidade organolética a 20°C.

O painel considera estas cervejas mais estáveis ao processo de deterioração organolético, apesar de se verificar uma diminuição da qualidade sensorial ao longo do

tempo de armazenamento. Esta diminuição de qualidade poderá estar associada ao aumento dos teores de feniletilacetato e fenilacetaldeído verificados a 20°C.

Observa-se que ao fim de 6 meses de armazenamento a 20°C, praticamente todos os lotes de cerveja analisados são classificados pelo painel como defeituosos, mas com defeitos dentro de um limite aceitável (entre 3 e 4, à exceção dos lotes C e E). A avaliação atribuída pelo painel ao fim de 3 meses de armazenamento a 20°C é muito similar à atribuída às cervejas armazenadas durante 6 meses a 4°C, o que indica que o grau de envelhecimento de uma cerveja armazenada 6 meses a 4°C é semelhante ao de uma cerveja armazenada durante 3 meses a 20°C. Esta tendência poderá ser explicada pelo facto da temperatura de armazenamento provocar um aumento da velocidade das reações químicas durante o armazenamento.

As cervejas dos lotes A e B aparentam ser mais sensíveis ao armazenamento a 20°C, verificando-se logo após 1 mês de armazenamento, uma diminuição da qualidade organolética de 6 para aproximadamente 3, próximo do valor considerado como não satisfatório. Nos lotes C,D e E verificou-se uma diminuição gradual da qualidade organolética em função do aumento do período de armazenamento (diminui de 6 para aproximadamente 4 nos lotes C e E, e de 6 para 3 nos lotes A, B e D).

4.1.3. Armazenamento a 37°C

A cerveja foi submetida a um processo de envelhecimento forçado a 37°C durante 3, 5 e 7 dias. Os resultados obtidos são apresentados na figura 19.

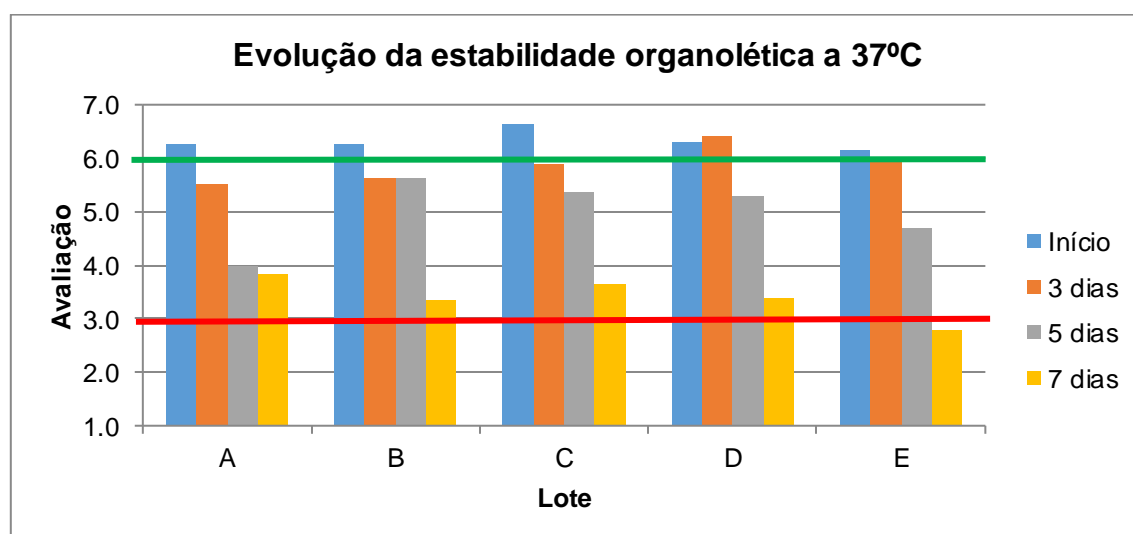


Figura 19: Representação gráfica da evolução da estabilidade organolética a 37°C.

O processo de envelhecimento forçado conduz à formação de compostos organoléticos indesejáveis que se traduzem numa perda de qualidade sensorial. Nesse sentido é possível observar (figura 19) que em todos os lotes de cerveja analisados, ocorre uma diminuição da qualidade sensorial. As cervejas dos lotes B, D e E aparentam ser mais sensíveis ao armazenamento a 37°C, verificando-se, ao fim de 7 dias, uma diminuição da avaliação da qualidade organolética de 6 para aproximadamente 3, valor este considerado como não satisfatório. Neste caso é clara a tendência do painel para rejeitar estas cervejas após armazenamento a 37°C durante 1 semana, em particular a cerveja do lote E, que foi considerada não satisfatória, ao contrário do observado a 20°C. Conclui-se, por isso, que a perda de qualidade observada a 20°C não é necessariamente reproduzida a 37°C.

4.2. Análise Cromatográfica

As concentrações de feniletilacetato e fenilacetaldeído foram monitorizadas ao longo de seis meses e os resultados obtidos encontram-se apresentados nos próximos subcapítulos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da temperatura na concentração dos compostos acima mencionados ao longo do tempo de armazenamento. O impacto do oxigénio a diferentes temperaturas de armazenamento também foi estudado.

4.2.1. Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do feniletilacetato

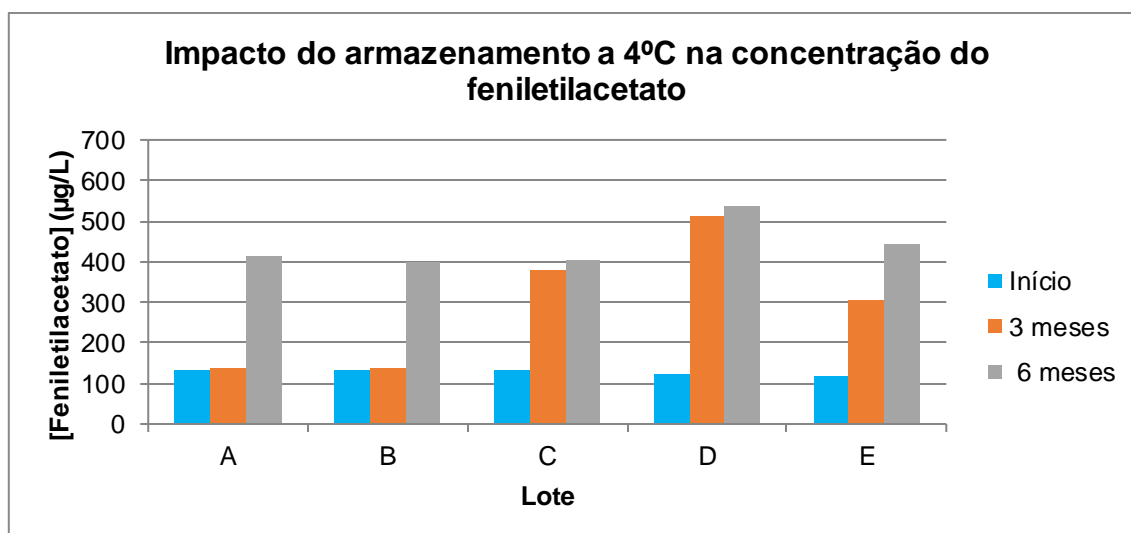


Figura 20: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 4°C na concentração do feniletilacetato.

Analisando o impacto do armazenamento a 4°C na concentração do feniletilacetato (figura 20) observa-se, que de um modo geral, há uma tendência para um aumento da concentração deste composto (5 a 6 vezes relativamente à concentração inicial) após 6 meses de armazenamento. É de certa forma expectável que o armazenamento da cerveja a esta temperatura não provoque grandes alterações nos teores de feniletilacetato uma vez que o armazenamento a baixas temperaturas atrasa todos os fenómenos associados ao envelhecimento.

Os resultados revelam um aumento mais acentuado na concentração do feniletilacetato, ao longo do tempo de armazenamento nas cervejas pertencente ao lote D que apresentam valores superiores aos dos restantes lotes analisados ao fim de 3

meses (510 $\mu\text{g/L}$) e ao fim de 6 meses (540 $\mu\text{g/L}$). Nas cervejas dos lotes A e B verifica-se que praticamente não há alteração da concentração de feniletilacetato entre o tempo inicial (aproximadamente 131 $\mu\text{g/L}$) e após 3 meses de armazenamento (aproximadamente 135 $\mu\text{g/L}$). O aumento mais acentuado nestes dois lotes verifica-se ao fim dos 6 meses (concentrações de aproximadamente 415 $\mu\text{g/L}$ e 399 $\mu\text{g/L}$, respetivamente).

O impacto do armazenamento a 20°C na concentração do feniletilacetato é ilustrado na figura 21.

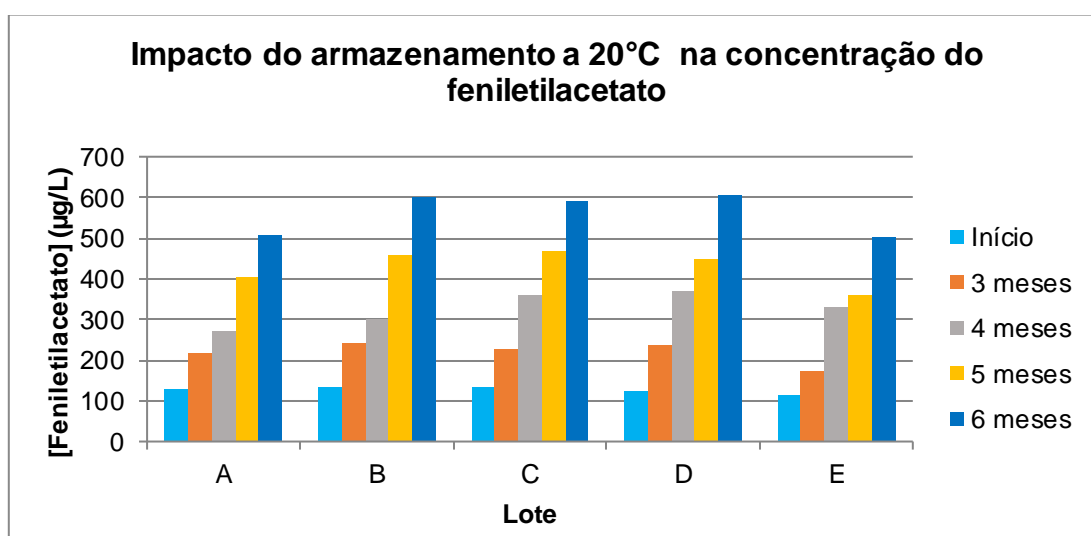


Figura 21: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 20°C na concentração do feniletilacetato.

Analisando a figura 21 verifica-se um aumento progressivo da concentração do feniletilacetato ao longo do período de armazenamento a 20°C (até 6 vezes relativamente à concentração inicial). Esta tendência é um indicador de que de facto esta temperatura de armazenamento favorecer a reação de formação deste composto ao longo do tempo de armazenamento.

As cervejas dos lotes B e D, após 6 meses de armazenamento, apresentam um aumento da concentração de etilfenilacetato 5 a 6 vezes relativamente à concentração registada inicialmente. As cervejas do lote E são as que apresentam menor concentração de feniletilacetato ao longo do tempo de armazenamento (505 $\mu\text{g/L}$).

Após armazenamento a 37°C (figura 22) verifica-se um aumento da concentração de feniletilacetato ao longo do armazenamento (4 a 5 a vezes relativamente à concentração registada inicialmente), ao fim de 14 dias.

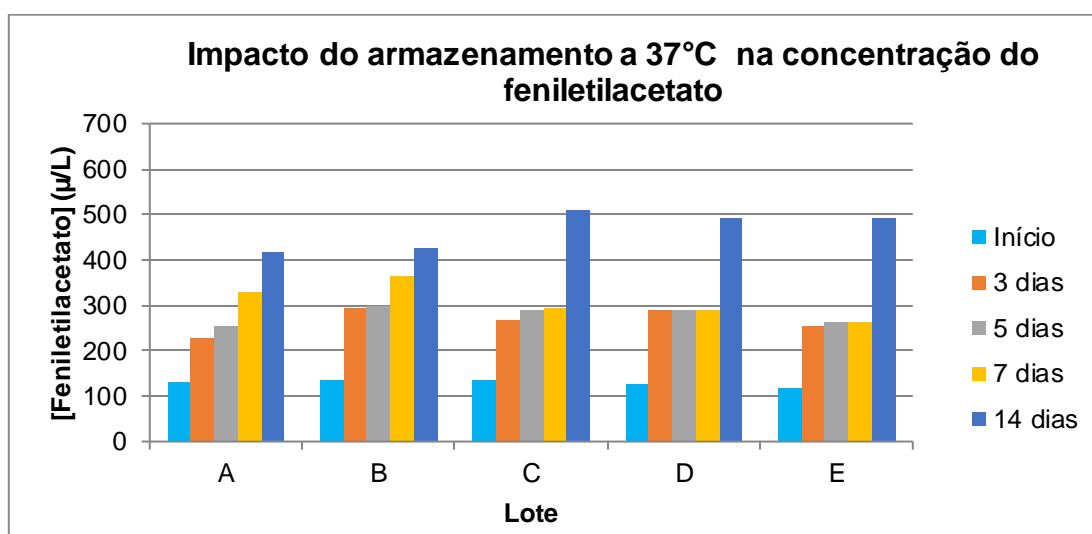


Figura 22: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 37°C na concentração do feniletilacetato.

Analisando o aumento registado entre os diferentes lotes analisados, verifica-se que as cervejas do lote C apresentam maiores concentrações de feniletilacetato ao fim de 14 dias (507µg/L) quando comparadas com os restantes lotes analisados.

O aumento na concentração de feniletilacetato após 7 dias de armazenamento a 37°C corresponde a cerca de metade da concentração do feniletilacetato (aproximadamente 300 µg/L) registada ao fim de 14 dias. Este comportamento poderá ser explicado pela própria temperatura a que a cerveja é submetida durante o processo de envelhecimento forçado, que fará com que o aumento do tempo de armazenamento provoque um aumento da concentração do etilfenilacetato.

4.2.2. Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do fenilacetaldéido

Analisando as figuras 23, 24 e 25 verifica-se que a temperatura de armazenamento não possui um forte impacto na concentração do fenilacetaldéido, isto porque não se verifica um aumento significativo da concentração deste composto ao longo do tempo de armazenamento.

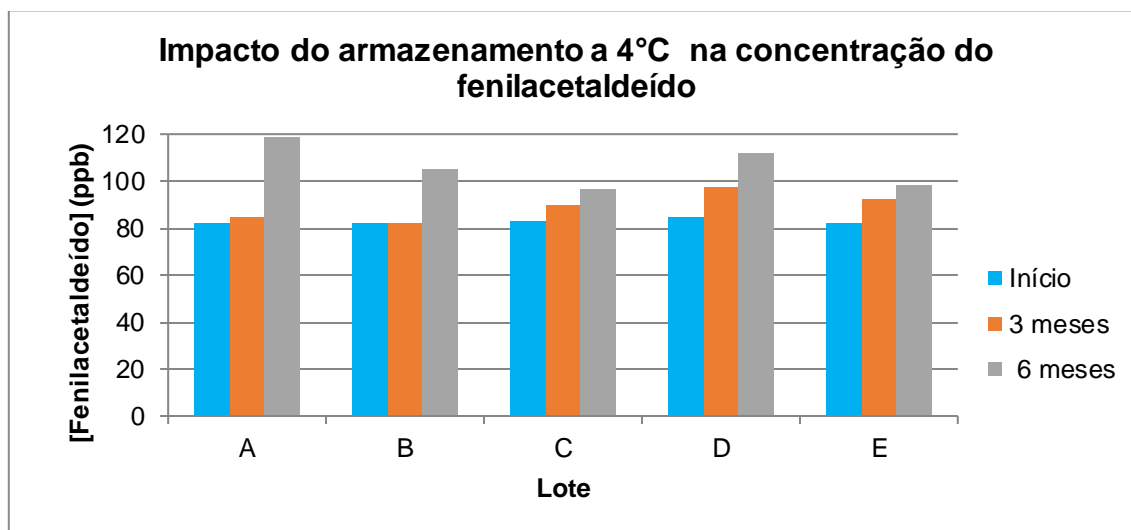


Figura 23: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 4°C na concentração do fenilacetaldéido.

Relativamente ao armazenamento a 4°C (figura 23) verifica-se que a concentração de fenilacetaldéido dos lotes A e B no início e após 3 meses de armazenamento praticamente não apresenta alteração. O aumento da concentração do fenilacetaldéido só se verificou ao fim de 6 meses de armazenamento. As cervejas do lote A são as que apresentam maior concentração de fenilacetaldéido após 6 meses de armazenamento (119 µg/L). Nas cervejas dos lotes C, D e E é possível verificar uma pequena variação da concentração do fenilacetaldéido no início e ao fim de 3 meses de armazenamento a 4°C, sendo que ao fim de 6 meses ocorre um ligeiro aumento, no entanto não muito acentuado.

Embora seja possível verificar um aumento, ao longo do período de armazenamento, na concentração do fenilacetaldéido na ordem dos 20% este composto não aparenta ser um bom marcador químico de envelhecimento da cerveja a 4°C.

Os resultados obtidos para o teor de fenilacetaldéido a 20°C (figura 24) indicam que as cervejas mantidas a esta temperatura sofrem um ligeiro aumento na concentração do fenilacetaldéido ao longo do tempo de armazenamento. Verifica-se

que existe uma tendência para o aumento da concentração deste volátil, sendo que no início registam-se teores próximos de 80 µg/L e no fim de 6 meses aproximadamente 120 µg/L (para o caso particular das cervejas do lote A). Conclui-se, pois, que o fenilacetaldéido não é um bom marcador químico de envelhecimento da cerveja a 20°C.

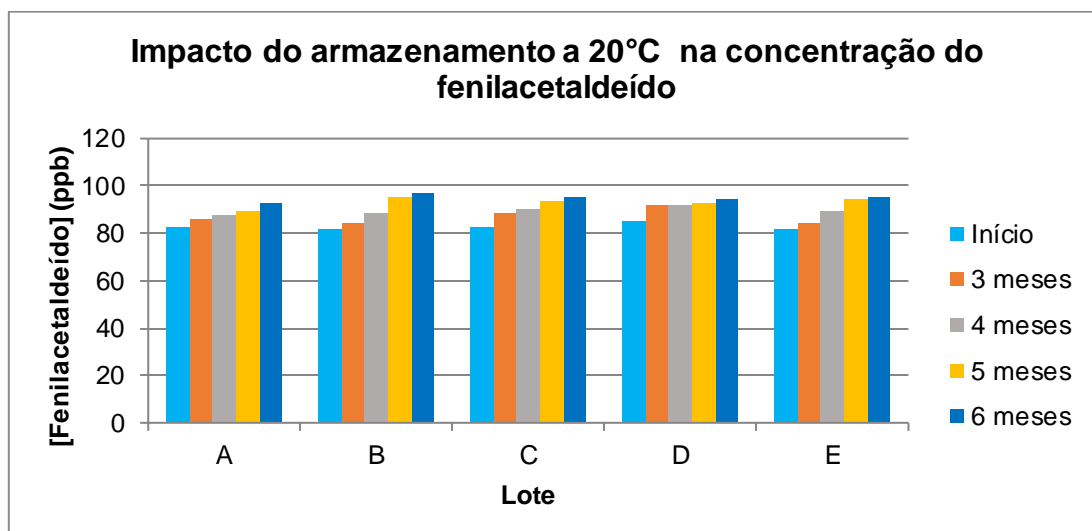


Figura 24: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 20°C na concentração do fenilacetaldéido.

A figura 25 representa o gráfico do impacto do armazenamento a 37°C na concentração do fenilacetaldéido, ao longo do tempo de armazenamento. O que se verifica é que a esta temperatura de armazenamento, tal como foi verificado para as restantes temperaturas de armazenamento analisadas, existe uma tendência pouco acentuada para o aumento da concentração deste volátil, sendo que ocorre um ligeiro aumento na concentração do fenilacetaldéido ao longo do tempo de armazenamento, mais nítido para a cerveja do lote B.

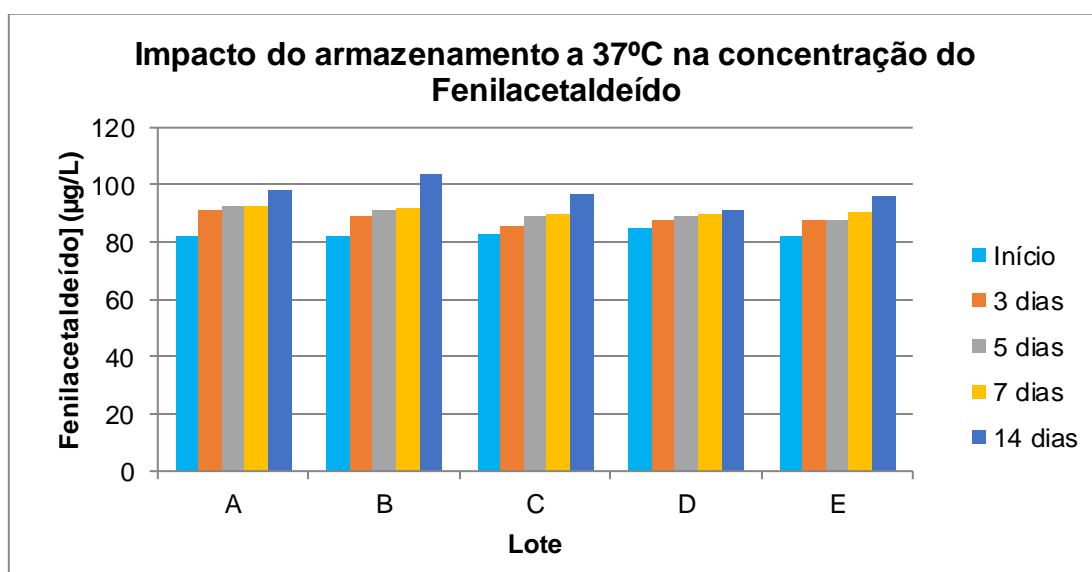


Figura 25: Representação gráfica do impacto do armazenamento a 37°C na concentração do fenilacetaldéido.

4.2.3. Influência do teor de oxigénio na concentração do feniletilacetato

Na figura 26 são apresentados os resultados obtidos sobre o impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato, para as cervejas armazenadas a 4°C.

Pode-se observar que o teor de oxigénio tem um claro impacto na concentração de feniletilacetato a 4°C. Após 3 meses de armazenamento, regista-se um aumento de 3 a 4 vezes relativamente à concentração inicial.

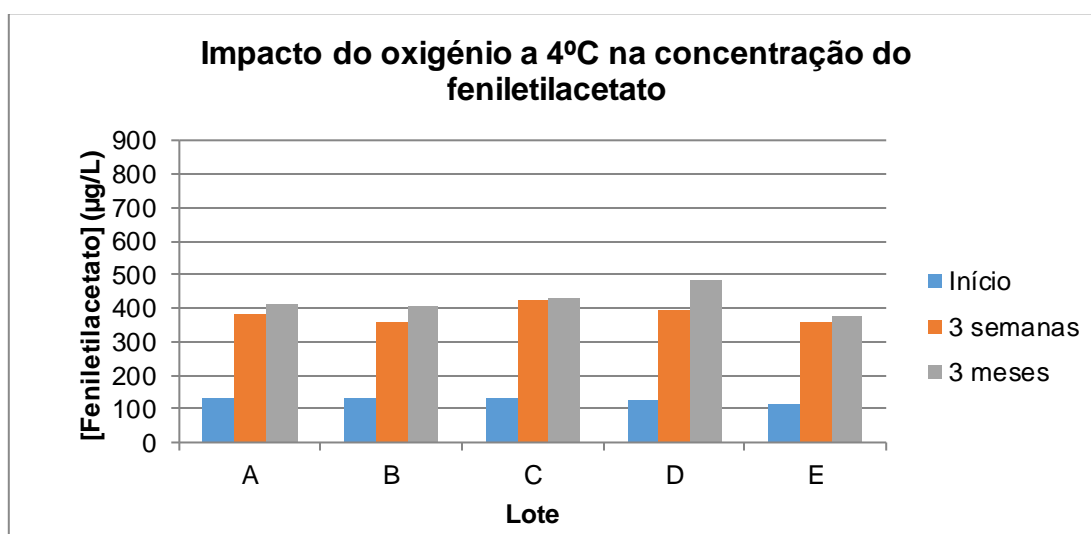


Figura 26: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 4°C.

Verifica-se, ainda, que em todos os lotes de cervejas analisados o aumento da concentração de feniletilacetato registado ao fim de 3 semanas de armazenamento é de até 2 a 3 vezes relativamente à registada inicialmente, no entanto estes valores não sofrem grandes alterações ao fim de 3 meses de armazenamento, mantendo-se muito próximos dos valores registados após 3 semanas de armazenamento a 4°C. Isto poderá ser um indicador de que o processo de formação deste composto a esta temperatura é muito rápido e ocorre logo no início do armazenamento atingindo de seguida um equilíbrio.

Ao fim de 3 meses de armazenamento sob a influência do oxigénio as amostras do lote D apresentam maior concentração de feniletilacetato (484 µg/L) do que os restantes lotes analisados.

A figura 27 representa o impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato, durante o armazenamento a 20°C.

O feniletilacetato apresenta-se como sendo um bom marcador químico de envelhecimento da cerveja com introdução de oxigénio a 20°C, pois é visível que o teor de oxigénio associado ao armazenamento a 20°C possui um forte impacto na concentração do feniletilacetato na medida em que se regista um aumento considerável da concentração deste composto.

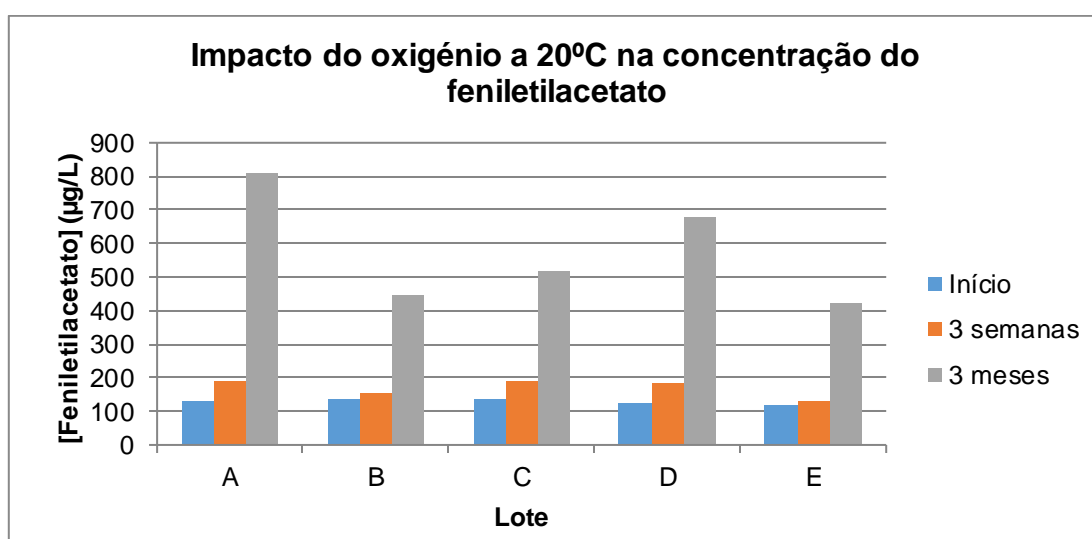


Figura 27: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 20°C.

No processo de envelhecimento a 20°C, verifica-se que os teores de feniletilacetato sofrem um aumento mais acentuado ao longo do tempo de armazenamento do que sucedeu a 4°C, sendo que a concentração máxima registada foi de 808 µg/L, para o lote A.

Entre o tempo inicial e as 3 semanas de armazenamento regista-se um aumento da concentração de feniletilacetato, mas este não é tão acentuado como o que se verifica à 4°C. No entanto, ao fim de 3 meses de armazenamento verifica-se um aumento de até 8 vezes relativamente à concentração registada a 4°C. Estes resultados dão a indicação de que este composto a 20°C, é influenciado não só pela temperatura mas também pelo teor de oxigénio durante o período de armazenamento, apesar deste impacto só se verificar ao fim de 3 meses.

Nas cervejas do lote A verifica-se um aumento mais acentuado da concentração do feniletilacetato (808 µg/L) quando comparada por exemplo com o aumento verificado para as cervejas do lote E (421 µg/L).

Observando a figura 28 verifica-se que o oxigénio não possui tanto impacto sobre a concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 37°C, como é observado durante o armazenamento a 20°C.

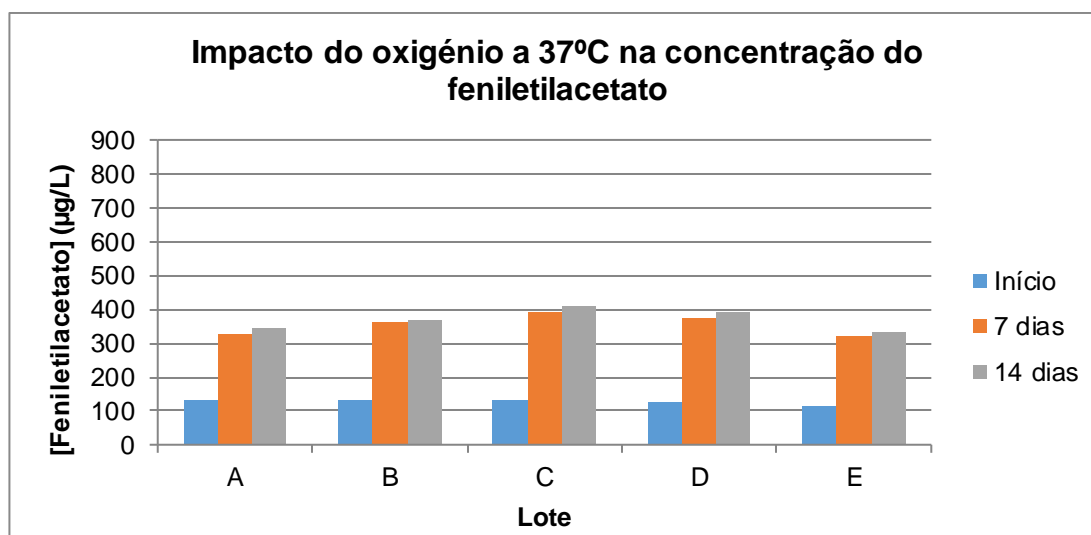


Figura 28: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do feniletilacetato durante o armazenamento a 37°C.

Entre o tempo inicial e o armazenamento a 37°C durante 7 e 14 dias regista-se um aumento da concentração de feniletilacetato entre 3 e 4 vezes relativamente à concentração registada inicialmente, para todos os lotes analisados. Observa-se que entre a cerveja com oxigénio armazenada a 37°C por 7 dias e 14 dias não existe uma diferença acentuada na concentração de feniletilacetato. O processo de formação deste composto a esta temperatura é muito rápido e ocorre logo no início do armazenamento atingindo de seguida um equilíbrio.

No armazenamento com oxigénio a 37°C durante 7 e 14 dias as cervejas do lote C são as que apresentam um aumento mais significativo da concentração de feniletilacetato (411 µg/L), seguidas das do lote D (391 µg/L) e por último as do lote B (371 µg/L). As cervejas do lote E apresentam um aumento da concentração de feniletilacetato na ordem dos 331 µg/L.

4.2.4. Influência do teor de oxigénio na concentração do fenilacetaldéido

Analisando a figura 29 observa-se que, de um modo geral, com a introdução de oxigénio e o armazenamento a 4°C há uma tendência para um aumento da concentração de fenilacetaldéido, registando-se ao fim de 3 meses de armazenamento um aumento de aproximadamente 20%.

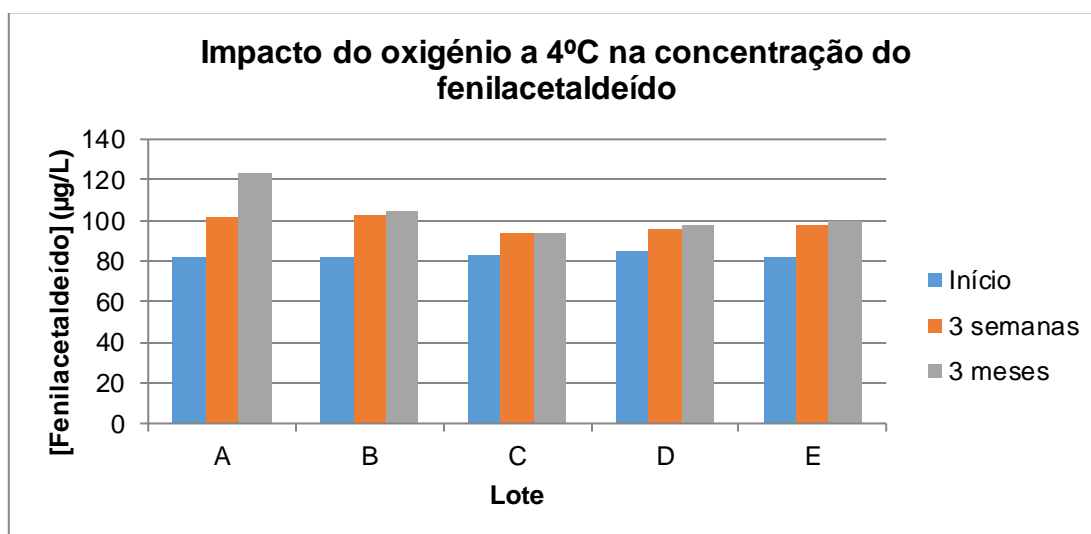


Figura 29: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 4°C.

Os incrementos do teor de fenilacetaldéido observados a 4°C nas cervejas com introdução de oxigénio aparentam ser bastante similares aos observados nas cervejas armazenadas a mesma temperatura mas sem introdução de oxigénio (na ordem dos 20%), podendo ser este comportamento uma indicação de que a 4°C todas as vias metabólicas que levam a formação deste composto são inibidas ou retardadas.

Entre 3 semanas e 3 meses de armazenamento praticamente não se observam diferenças na concentração de fenilacetaldéido. No caso particular das cervejas do lote C o valor da concentração de fenilacetaldéido obtido para as cervejas armazenadas a 4°C por 3 semanas é praticamente igual ao obtido após 3 meses de armazenamento.

As cervejas do lote A são as que sofrem um aumento mais acentuado de fenilacetaldéido tanto ao fim de 3 semanas (102 µg/L) como ao fim de 3 meses (123 µg/L), seguidas pelas cervejas do lote B.

A figura 30 representa o impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 20°C. É possível verificar que a introdução de oxigénio e o armazenamento a 20°C possui um impacto significativo na concentração do fenilacetaldéido, pois verifica-se um aumento acentuado deste composto (até 12 vezes relativamente à concentração inicial).

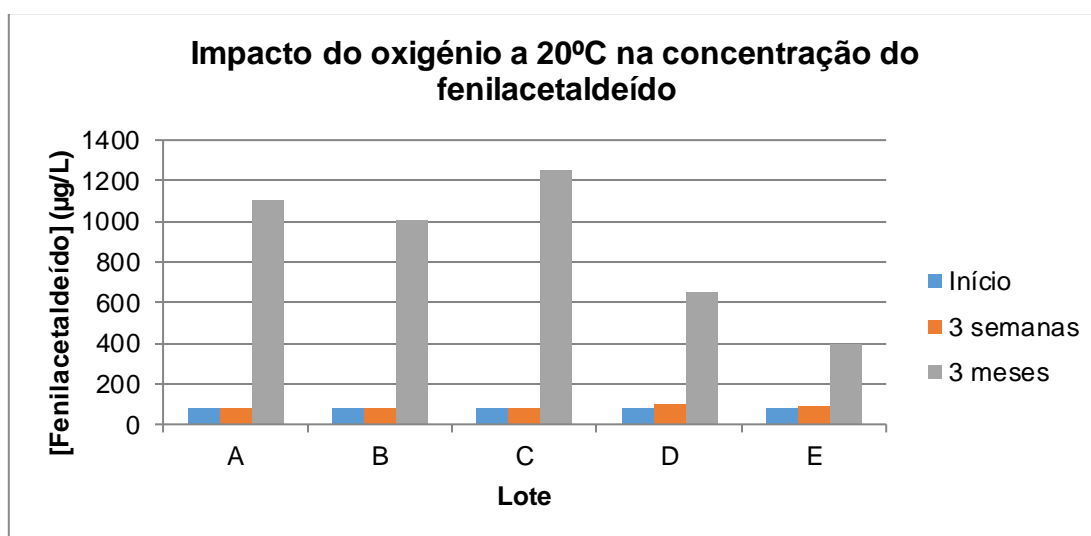


Figura 30: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 20°C.

O fenilacetaldéido apresenta-se como sendo um bom marcador químico de envelhecimento da cerveja com introdução de oxigénio e armazenadas a 20°C, pois é visível que o teor de oxigénio associado ao armazenamento a 20°C possui um forte impacto na concentração deste composto ao fim de 3 meses de armazenamento. O fenilacetaldéido através da reação de redução origina a formação de 2-feniletanol. Com a introdução de oxigénio ocorre o processo inverso, o 2-feniletanol é oxidado a fenilacetaldéido. Esta poderá ser uma possível justificação para os elevados níveis de fenilacetaldéido verificados. O fenilacetaldéido pode, pois, ser usado como marcador de defeitos sensoriais graves, tendo como origem a introdução de oxigénio, por exemplo, nas condutas ou linhas de enchimento.

Entre o tempo inicial e as 3 semanas de armazenamento praticamente não se verifica um aumento na concentração do fenilacetaldéido, no entanto ao fim de 3 meses de armazenamento consegue-se verificar que de facto a introdução de oxigénio a esta temperatura provoca um aumento acentuado da concentração deste composto. Após 3 meses de armazenamento foi possível quantificar concentrações de fenilacetaldéido na

ordem dos 1250 µg/L, um aumento muito superior ao registado tanto no inicial como ao fim de 3 semana. As cervejas do lote C apresentam a maior concentração de fenilacetaldéido (1254 µg/L), de seguida são as do lote A (1105 µg/L) e por último as do B (10 10 µg/L). As cervejas que apresentam concentrações mais baixas de fenilacetaldéido são as do Lote E (400 µg/L) seguida das do lote D (655 µg/L. Entre o tempo inicial e as 3 semanas de armazenamento praticamente não se verifica um aumento na concentração do fenilacetaldéido, no entanto ao fim de 3 meses de armazenamento consegue-se verificar que de facto a introdução de oxigénio a esta temperatura provoca um aumento acentuado da concentração deste composto. Após 3 meses de armazenamento foi possível quantificar concentrações de fenilacetaldéido na ordem dos 1254 µg/L (lote C), um aumento muito superior ao registado tanto no inicial como ao fim da terceira semana. Após 3 meses de armazenamento, as cervejas do lote C apresentam a maior concentração de fenilacetaldéido (1254 µg/L), de seguida são as do lote A (1105 µg/L) e por último as do B (1010 µg/L). As cervejas que apresentam concentrações mais baixas de fenilacetaldéido são as do Lote E (399 µg/L) seguida das do lote D (655 µg/L).

Analisando a figura 31 constata-se que, tal como sucedeu com a introdução de oxigénio a 4°C, no armazenamento a 37°C há uma tendência para um aumento da concentração deste composto, registando-se ao fim de 3 meses um aumento de aproximadamente 20%.

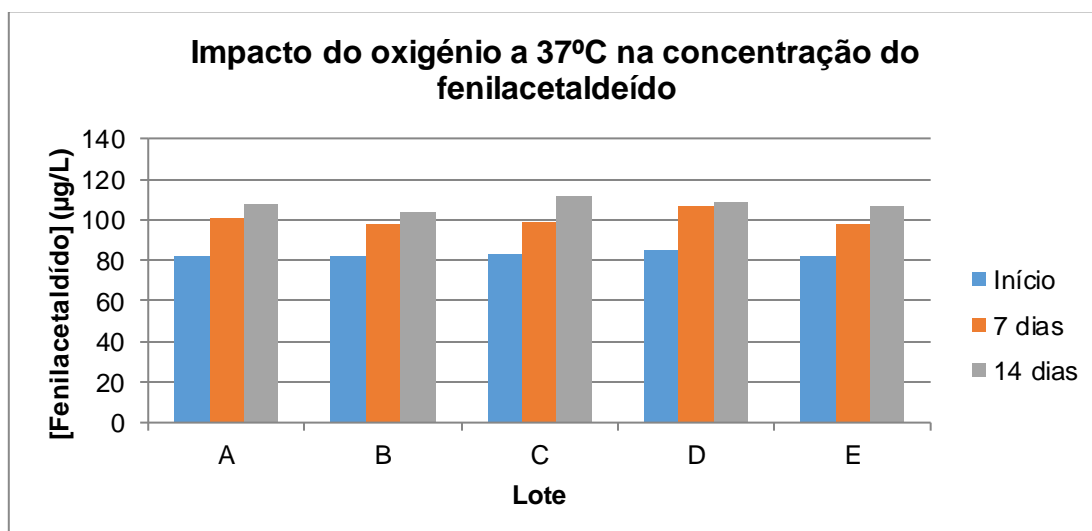


Figura 31: Representação gráfica do impacto do oxigénio na concentração do fenilacetaldéido durante o armazenamento a 37°C.

Entre o tempo inicial e o armazenamento por 7 e 14 dias praticamente não se observam diferenças na concentração do fenilacetaldeído, há um ligeiro aumento na ordem dos 10%. Os lotes B e C apresentam praticamente os mesmos valores de concentração de fenilacetaldeído ao fim de 7 dias de armazenamento (aproximadamente 98 µg/L), mas ao fim de 14 dias de armazenamento nas cervejas do lote C regista-se um aumento da concentração (aproximadamente 111 µg/L), sendo este o valor mais alto de fenilacetaldeído observado para todos os lotes armazenados durante os 14 dias. No caso particular das cervejas do lote D o valor da concentração de fenilacetaldeído obtido para as cervejas armazenadas durante 7 dias é praticamente idêntico ao obtido após o armazenamento por 14 dias.

4.3. Análise Estatística

O estudo analítico do grau de envelhecimento sensorial da cerveja foi obtido por meio da determinação de indicadores químicos de envelhecimento. O feniletilacetato e o fenilacetaldeído demonstram ser bons indicadores químicos do envelhecimento da cerveja e correlacionam-se bem com o grau de deterioração sensorial da cerveja.

A análise estatística foi aplicada para determinar a relação entre a concentração dos marcadores químicos de envelhecimento investigados e as avaliações obtidas na análise sensorial. Pretende-se também determinar qual o marcador que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética da cerveja e que, por isso, poderá ser usado para prever o comportamento durante o período de armazenamento.

A análise de componentes principais (PCA) e a regressão linear múltipla (MLR) foram os testes estatísticos aplicados.

4.3.1. Análise Sensorial versus Análise Cromatográfica

O teste de PCA é uma técnica multivariável que fornece um método de extração de dados a partir da variância/covariância ou matriz de correlação. Como a concentração dos dois compostos analisados (feniletilacetato e fenilacetaldeído) e a análise sensorial possuem diferentes magnitudes, os dados foram auto escalados, resultando em 3 características com uma média de zero e a variância de um.

A figura 32 representa a análise de PCA para o 1º e o 2º componente principal (F1 e F2) para todas as sessenta amostras de cervejas nas diferentes condições de armazenamento (tempo e temperatura) analisadas.

É possível verificar que a análise sensorial é a única variável encontrada no lado negativo do fator 1. Isto pode ser explicado uma vez que a análise sensorial é o único termo que permite uma correlação direta com as qualidades organoléticas da cerveja. O feniletilacetato (41%) e o fenilacetaldeído (37%) que se encontram no lado positivo do fator 1 são os termos que contribuem mais para o primeiro componente principal. Na verdade, 93% da variância total do sistema é explicada pelos primeiros dois fatores, com o fator 1 (F1) contabilizando um valor de 78% da variância total.

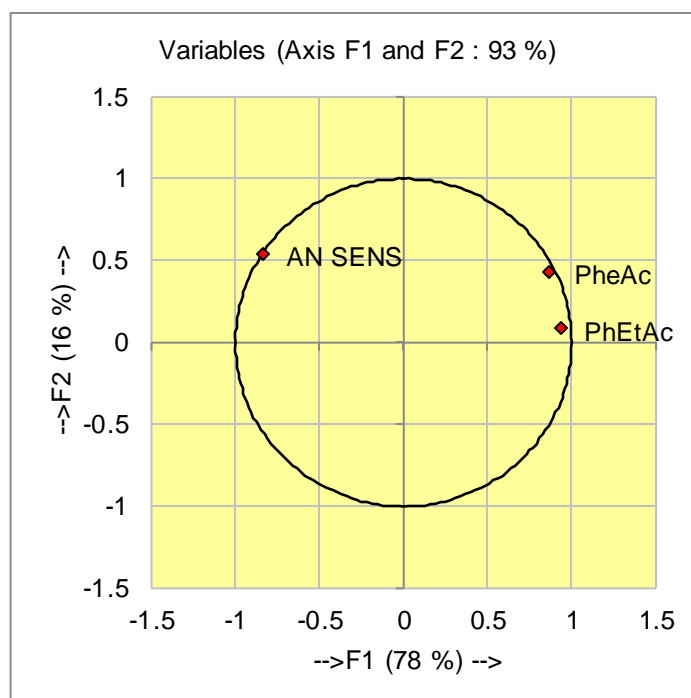


Figura 32: Resultados obtidos por PCA para as 60 amostras de cerveja armazenadas a 4, 20 e 37°C (durante um período total de 6 meses de armazenamento) e as 3 variáveis consideradas.

É possível verificar que, apesar do feniletilacetato e do fenilacetaldeído demonstrarem uma correlação direta com a qualidade organolética da cerveja, para as diferentes condições de armazenamento (figura 32 e tabela 12) o feniletilacetato pode ser considerado o melhor marcador químico de estabilidade organolética da cerveja pois é o que se encontra mais próximo do plano oposto formado pelos dois primeiros eixos e possui um coeficiente de correlação de *Pearson* ($r = -0,69$; $p < 0,05$) superior ao do fenilacetaldeído ($r = -0,53$; $p < 0,05$).

Tabela 12: Coeficiente de correlação de *Pearson* e de *Spearman* obtidos para as 3 variáveis em estudo. A negrito são indicados os valores significativamente estatísticos, para um nível de significância de 95%.

Coeficiente de Correlação de <i>Pearson</i> (r)				Coeficiente de Correlação de <i>Spearman</i> (p)			
	Análise Sensorial	PheEtAc	PheAc		Análise Sensorial	PheEtAc	PheAc
Análise Sensorial	1,0				1,0		
PheEtAc	- 0,69	1,0			- 0,72	1,0	
PheAc	- 0,53	0,77	1,0		- 0,69	0,90	1,0

PheEtAc- feniletilacetato; PheAc- fenilacetaldeído.

Na tabela 12 são apresentados os coeficientes de correlação (*Pearson* e *Spearman*) entre as 3 variáveis em estudo de modo a avaliar nível de correlação entre a qualidade sensorial e os níveis de feniletilacetato e fenilacetaldeído determinados. Os

resultados apresentados são referentes a todas as 60 amostras de cerveja analisadas para as diferentes temperaturas estudadas. Tanto o coeficiente de correlação de *Pearson* como o de *Spearman* (tabela 12) confirmam a hipótese de que estes marcadores químicos podem ser utilizados como indicadores químicos do envelhecimento da cerveja, pois verificou-se uma correlação estatisticamente significativa entre os seus níveis de concentração e os dados da avaliação sensorial.

Quando comparamos os coeficientes de correlação de *Spearman* e *Pearson* obtidos verificamos que o coeficiente de *Spearman* demonstra haver uma melhor correlação entre os níveis de voláteis e a análise sensorial.

O teste de PCA também foi aplicado aos dados obtidos da análise das cervejas armazenadas a temperatura de 4, 20 e 37°C individualmente, de forma a avaliar qual o marcador químico que melhor reflete o impacto na qualidade organolética da cerveja a cada uma destas temperaturas.

Tabela 13: Coeficiente de correlação de *Pearson* obtidos para as cervejas armazenadas a diferentes temperaturas. A negrito são indicados os valores significativamente estatísticos, para um nível de significância de 95%.

		Coeficiente de Correlação de <i>Pearson</i> (r)		
		Análise Sensorial	PheEtAc	PheAc
4°C	Análise Sensorial	1,0		
	PheEtAc	- 0,79	1,0	
	PheAc	- 0,87	0,85	1,0
20°C	Análise Sensorial	1,0		
	PheEtAc	- 0,82	1,0	
	PheAc	- 0,72	0,91	1,0
37°C	Análise Sensorial	1,0		
	PheEtAc	- 0,63	1,0	
	PheAc	- 0,70	0,85	1,0

PheEtAc- feniletilacetato; *PheAc*- fenilacetaldeído.

A determinação do coeficiente de correlação de *Pearson* permitiu verificar que entre a análise sensorial e o teor de feniletilacetato e de fenilacetaldeído obtidos existe uma correlação significativamente estatística (tabela 13). Estes resultados vão de encontro aos verificados anteriormente (tabela 12).

No armazenamento a 4°C e a 37°C o fenilacetaldeído revelou ser o melhor marcador químico de envelhecimento que melhor se correlaciona com a análise sensorial, mas no armazenamento a 20°C já o feniletilacetato demonstra ser o melhor marcador químico que o fenilacetaldeído.

Verifica-se que o coeficiente de correlação de *Pearson* obtido, entre a análise sensorial e o teor de feniletilacetato, é inferior no envelhecimento a 37°C ($r = -0,63$; $p < 0,05$) quando comparado com o envelhecimento natural a 20°C ($r = -0,82$; $p < 0,05$). Isto pode estar relacionado com o facto de se verificar níveis mais baixos de feniletilacetato na cerveja durante o envelhecimento a 37°C (figura 22) do que a 20°C (figura 21).

A figura 33 ilustra a correlação entre a análise sensorial e a concentração de feniletilacetato para as diferentes temperaturas analisadas (4, 20 e 37°C) durante os 6 meses de armazenamento.

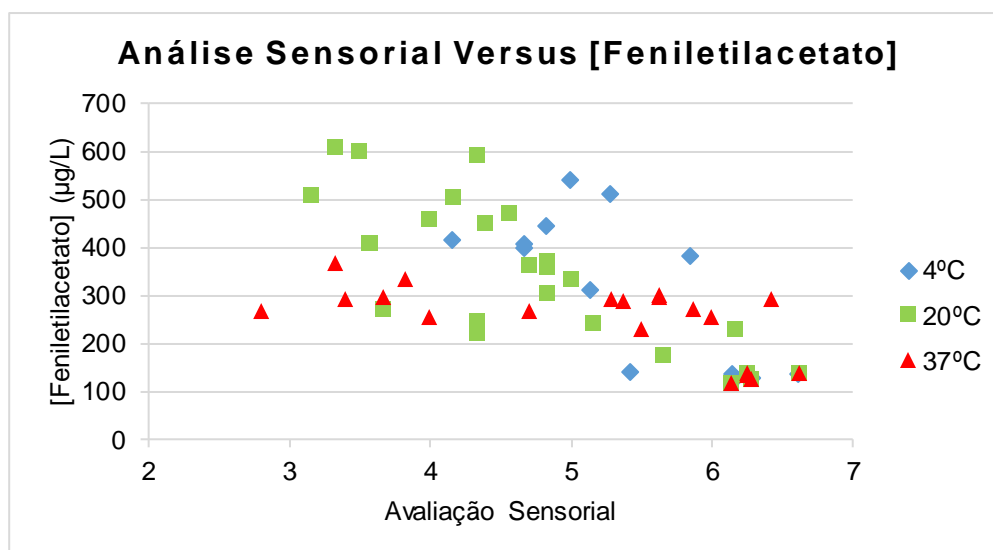


Figura 33: Correlação entre a avaliação sensorial e a concentração de feniletilacetato para as diferentes temperaturas analisadas (4, 20 e 37°C) durante os 6 meses de armazenamento.

É possível verificar que o aumento da concentração de feniletilacetato traduz-se numa diminuição da qualidade sensorial. Esta diminuição de qualidade é mais perceptível para as cervejas armazenadas a 20°C.

Na figura 34 é apresentada a correlação entre a análise sensorial e a concentração de fenilacetaldéido para as diferentes temperaturas analisadas (4, 20 e 37°C). Verifica-se que, o aumento na concentração deste composto traduz-se numa diminuição da qualidade sensorial, sobretudo quando o armazenamento é efetuado a 20°C.

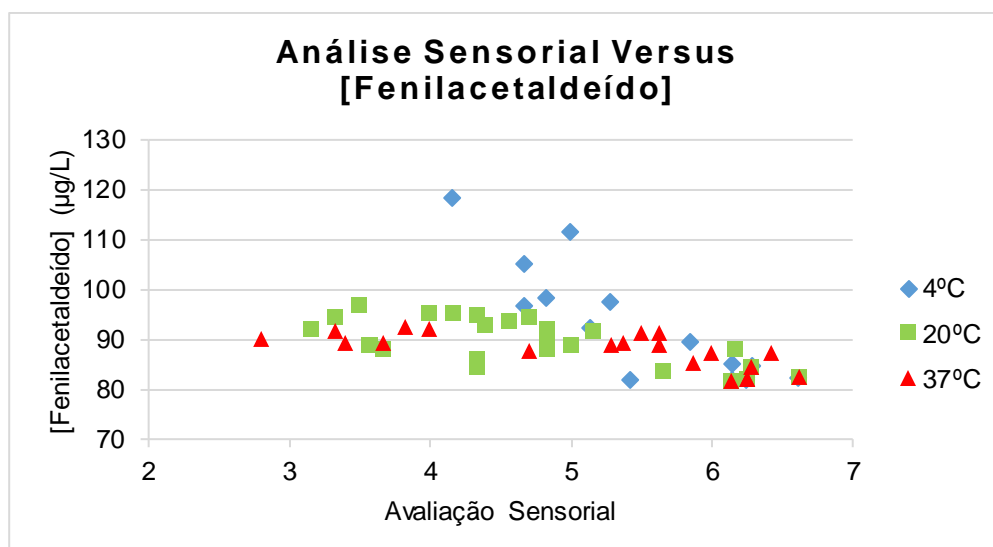


Figura 34: Correlação entre a avaliação sensorial e a concentração de fenilacetaldéido para as diferentes temperaturas analisadas (4, 20 e 37°C) durante os 6 meses de armazenamento.

Também foi possível verificar observando a figura 35 que entre o teor de feniletilacetato e de fenilacetaldéido existe uma correlação estatisticamente significativa ($r = 0,77$ e $p = 0,90$; $p < 0,05$), quando são consideradas todas as cervejas a todas as temperaturas de armazenamento.

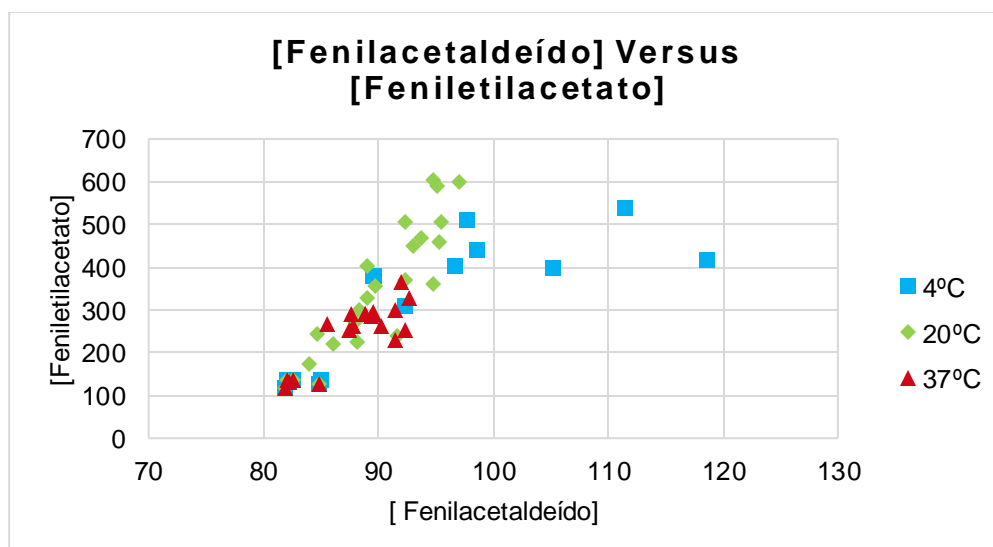


Figura 35: Ilustração da correlação entre o feniletilacetato e o fenilacetaldéido.

A indústria cervejeira tem desde há muito demonstrado um grande interesse em testes preditivos que possam estimar o grau de envelhecimento da cerveja durante o período de armazenamento. Muitos métodos e testes preditivos baseados nas características sensoriais, indicadores químicos, radicais livres ou no potencial redox são conhecidos. No entanto devido a complexidade resultante do vasto número de fatores envolvidos no processo de envelhecimento da cerveja, a maioria destes testes não são aplicados com sucesso.

Embora a previsão do tempo de vida útil não tenha sido um objetivo deste estudo, uma parte da regressão linear múltipla (MLR) foi aplicada para desenvolver uma função capaz de prever o “comportamento sensorial” de uma cerveja a partir da concentração dos indicadores químicos estudados. Foi obtida a seguinte equação:

Equação 3:

$$\text{Análise sensorial} = 7.929 - 0.004 [\text{Feniletacetato}] - 0.019 [\text{Fenilacetaldeído}]$$

Através desta equação será possível prever o grau de deterioração sensorial da cerveja em função da concentração do feniletacetato e do fenilacetaldeído. É nos também possível determinar qual o composto que possui um maior impacto na estabilidade organolética da cerveja de modo a se poder prever qual o composto volátil que á retardar ou inibir o seu aparecimento no caso de se pretender prolongar o período de validade da cerveja.

Tabela 14: Melhor subconjunto de variáveis explicativas obtidas através por MRL

	PhEtAc	PheAc	Fitted R2
1 variables	X		0,375
2 variables	X	X	0,371

PhEtAc- feniletacetato; PheAc- fenilacetaldeído.

Embora a equação obtida através da regressão linear múltipla obtida afirme que o feniletacetato e o fenilacetaldeído possuem impacto na qualidade organolética da cerveja, verifica-se (tabela 14) que o fenilacetaldeído possui um maior efeito sobre a qualidade sensorial da cerveja do que o feniletacetato. Assim sendo, pode-se concluir que no caso de se pretender aumentar o período de validade da cerveja este deverá ser o composto volátil á retardar ou inibir.

5. Conclusão

Pretendeu-se com este trabalho avaliar o impacto da temperatura de armazenamento e do oxigénio na estabilidade organolética da cerveja. O perfil de alguns compostos voláteis, tais como fenilacetaldeído, feniletilacetato e etilfenilacetato, responsáveis pelo desenvolvimento de aromas e sabores doces e a mel, foi monitorizado durante o envelhecimento natural (20°C durante 6 meses) e o envelhecimento forçado (3,5,7 e 14 dias a 37°C). As cervejas mantidas a 4°C foram utilizadas como controlo. A estabilidade organolética foi avaliada por um painel de provadores treinados, e os dados sensoriais foram comparados com o perfil de compostos voláteis obtidos.

Os resultados obtidos permitem concluir que o decréscimo de qualidade sensorial observado na cerveja se traduz num aumento dos teores de feniletilacetato e de fenilacetaldeído, ao longo do tempo de armazenamento.

As cervejas armazenadas a 4°C não apresentam diferenças significativas a nível sensorial, sendo que também não se verificam alterações consideráveis nos teores de feniletilacetato e fenilacetaldeído ao longo do tempo de armazenamento. No entanto, verificou-se que o armazenamento da cerveja a 20 e a 37°C possui um forte impacto na estabilidade organolética da cerveja. Esta tendência é acompanhada pelo aumento do teor destes voláteis.

Analisando os resultados obtidos no estudo do impacto da temperatura verifica-se que o feniletilacetato demonstra ser um melhor marcador químico de temperatura do que o fenilacetaldeído, pois registam-se aumentos no teor de feniletilacetato até 6 vezes relativamente à concentração inicial.

O estudo do impacto do oxigénio a diferentes temperaturas de armazenamento na concentração do feniletilacetato e do fenilacetaldeído, permite-nos concluir que o teor de oxigénio associado ao armazenamento a 20°C tem um forte impacto na concentração do fenilacetaldeído, pois observa-se um aumento na concentração até 12 vezes relativamente à concentração inicial nos teores deste volátil. O fenilacetaldeído pode, pois, ser usado como marcador de defeitos sensoriais graves, tendo como origem a introdução de oxigénio, por exemplo, nas condutas ou linhas de enchimento.

Aplicou-se análise estatística para determinar qual o marcador que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética da cerveja durante o período de

armazenamento. Tanto o coeficiente de correlação de *Pearson* como o coeficiente de correlação de *Spearman* confirmam a hipótese de que estes compostos químicos podem ser utilizados como bons indicadores do envelhecimento da cerveja, pois verificou-se uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os níveis de feniletilacetato e fenilacetaldeído e a análise sensorial.

Os resultados obtidos no estudo do impacto da temperatura na estabilidade organolética da cerveja demonstram que o feniletilacetato é o marcador químico que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética da cerveja, quando consideradas todas as temperaturas ($r = -0,69$, $p = -0,72$; $p < 0,05$). Na análise individual para cada temperatura verifica-se que a 20°C o feniletilacetato continua a ser o marcador químico que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética ($r = -0,82$; $p < 0,05$). No armazenamento a 4 e a 37°C já é o fenilacetaldeído que melhor se correlaciona com a estabilidade organolética da cerveja ($r = -0,87$ e $r = -0,70$ respetivamente; $p < 0,05$).

Também foi possível verificar que entre o teor de feniletilacetato e de fenilacetaldeído existe uma correlação estatisticamente significativa ($r = 0,77$ e $p = 0,90$; $p < 0,05$), quando são consideradas as cervejas armazenadas a todas as temperaturas.

Conclui-se, portanto, que o fenilacetaldeído deverá ser o marcador químico selecionado no caso de se suspeitar da introdução de ar (oxigénio) nas condutas ou linhas de enchimento. Por outro lado, o feniletilacetato é o marcador químico que melhor se correlaciona com a temperatura de armazenamento. Como tal, poderá ser usado para estimar a temperatura a que a cerveja esteve armazenada. Além disso, correlaciona-se bem com a degradação sensorial da cerveja à temperatura ambiente, podendo ser usado como indicador do período de validade da cerveja.

5.1. Perspetivas Futuras

De forma a dar continuidade ao trabalho experimental realizado, sugerem-se alguns trabalhos futuros.

Uma das sugestões passa pela substituição da extração líquido-líquido que utiliza solventes orgânicos, por extração em fase sólida (SPE).

Seria importante acompanhar a evolução do feniletilacetato e do fenilacetaldeído por um período maior de tempo (ex. um ano), de forma a avaliar, de uma forma mais precisa, os efeitos que o aumento da concentração destes compostos provoca na estabilidade organolética da cerveja.

Por outro lado, seria também interessante tentar identificar, para além do teor de oxigénio e da temperatura, que outros parâmetros podem influenciar a estabilidade organolética da cerveja durante o período de armazenamento, tais como a exposição à radiação luminosa (foto-oxidação).

Uma outra proposta de trabalho futuro, envolve a realização de um estudo sobre a evolução do feniletilacetato, do feniletilacetato e do fenilacetaldeído em outros tipos de cervejas. Assim, seria possível constatar se o comportamento verificado para estes compostos analisados só ocorre neste tipo de cervejas ou se ocorrerá também em outros tipos de cerveja (ex. cerveja preta).

Referências Bibliográficas

- [1] Unicer- Bebidas SA [online] <http://www.unicer.pt/>
- [2] SuperBock [online] <http://www.superbock.pt/>
- [3] Eßlinger, H. M. (2009), Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets. John Wiley & Sons, Alemanha.
- [4] Cervejas do mundo. [Online] [Acedido em: 30 de Maio de 2016.] <http://www.cervejasdomundo.com/EraModerna.htm>
- [5] Galvão, M.P. (1997) A Química da Cerveja. Jornal de Química, 65: 6-12.
- [6] Kunze, W. (1999), Technology Brewing and Malting. VLB. Berlim, 1999, 2ª Edição International.
- [7] Linko, L., et al. (1998), Recent Advances in the Malting and Brewing Industry. Journal of Biotechnology, 65: 85-98.
- [8] Lodolo, E., et al. (2008), The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8:1018-1036.
- [9] Hough, J. S., et al. (1982), Malting and Brewing Science., Chapman and Hall, Londres, 2º Edição, volume 2. 1982.
- [10] Guido, L.F., et al. (2004), The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chemistry*, 87:187–193.
- [11] Bamforth, C. W., et al. (2009), The flavor Instability of Beer in Beer: A Quality Perspective (Handbook of Alcoholic Beverages), 1: 85-109.
- [12] Guido, L.F. (2004), Factors affecting beer flavour stability: studies on the whole process from barley to beer. PhD Thesis. Universidade do Porto.

- [13] Saison, D., et al. (2009), Contribution of staling compounds to the aged flavor of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry* 114: 1206–1215.
- [14] Vanderhaegen, B., et al. (2007), The Chemistry of Beer Aging - a critical review. *Food Chemistry*, 95: 357-381.
- [15] Guido, L.F., et al. (2007), Predicting the organoleptic stability of beer from chemical data using multivariate analysis; *European Food Research and Technology*, 226:57-62
- [16] Cejka P. et al. (20013), Use of Chemical Indicators of Beer Aging for Ex-post Checking of Storage Conditions and Prediction of the Sensory Stability of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 12670–12675.
- [17] Rodrigues, J. A., et al. (2011), Evaluation of beer deterioration by gas chromatography – mass spectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition. *Journal of Chromatography A*, 1218: 990–996.
- [18] Bamforth, C. W. (2010), Flavour changes in beer: oxidation and other pathways in oxidation in foods and beverages and antioxidant Applications: Management in different industry sectors. Volume 2. Edited by Woodhead Publishing in Food Science, Technology And Nutrition.
- [19] Vanderhaegen, B., et al. (2007), Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry* 103: 404–412.
- [20] Stewart, G. G. (2004), The Chemistry of Beer Instability. *Journal of Chemical Education*. 81: 7.
- [21] Noel, S., et al. (1999), The use of Oxygen 18 in appraising the impact of oxidation process during beer storage in Oxidation process during beer storage. 105, 5:269-274.
- [22] Kamigana, Y., et al. (2006), Plant Phenylacetaldehyde Synthase Is a Bifunctional Homotetrameric Enzyme That Catalyzes Phenylalanine

Decarboxylation and Oxidation. The Journal of Biological Chemistry, 281, 33: 23357–23366.

- [23] Soares da Costa, M., et al. (2004), Further Insights into the Role of Methional and Phenylacetaldehyde in Lager Beer Flavor Stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 7911–7917.
- [24] BRAVO, A., et al. (2008), Formation of r-Dicarbonyl Compounds in Beer during Storage of Pilsner. J. Agric. Food Chem, 56: 4134–4144.
- [25] Farhi, M., et al. (2010), Identification of rose phenylacetaldehyde synthase by functional complementation in yeast. Journal of Plant Molecular Biology, 72:235–245.
- [26] SAKAI, et al. (2007), Production of 2-Phenylethanol in Roses as the Dominant Floral Scent Compound from L-Phenylalanine by Two Key Enzymes, a PLP-Dependent Decarboxylase and a Phenylacetaldehyde Reductase. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 71 (10):2408–2419.
- [27] Etschmann, M.M.W., et al. (2002), Biotechnological production of 2-phenylethanol. Appl Microbiol Biotechnol, 59:1–8.
- [28] Albertazzi, E., et al. (1994), Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. Biotechnology Letters, 16.5: 491-496.
- [29] Fukuda, K., et al. (2014), Breeding of Brewing Yeast Producing a Large Amount of L-Phenylethyl Alcohol and L- Phenylethyl Acetate. Agricultural and Biological Chemistry, 54, 1:269-271.
- [30] VERSTREPEN, K.J., et al. (2003), Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer -REVIEW. Journal of bioscience and bioengineering, 96, 2: 110-118.
- [31] Fabre, C.E., et al. (1998), 2-Phenylethyl alcohol: an aroma profile. Perfum Flavor, 23:43–45.

- [32] Hoff, S., et al. (2013), Storage stability of pasteurized non-filtered beer. *Journal of Institute of Brewing*, 119: 172–181.
- [33] Chia-Hung, K., et al. (2012), Enzymatic synthesis of rose aromatic ester (2-phenylethyl acetate) by lipase. *Journal of Science Food Agriculture*, 92: 2141–214.
- [34] Etschmann, M.W., et al. (2005), Production of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethylacetate from L-Phenylalanine by Coupling Whole-Cell Biocatalysis with Organophilic Pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 5.
- [35] Tat, L., et al. (2007), Sweet-like off-flavor in aglianico del vulture wine: Ethyl phenylacetate as the mainly involved compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (13):5205-5212.
- [36] Campo, E., et al. (2011), Consumer rejection threshold of ethyl phenylacetate and phenylacetic acid, compounds responsible for the sweet-like off odour in wines made from sour rotten grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18: 280–286.
- [37] Xun Tian., et al. (2015), Biotransformation and Production from *Hansenula Anomala* to Natural Ethyl Phenylacetate. *Web of Conferences* 22: 05- 13.
- [38] Jolliffe, I.T. (1986), *Principal Component Analysis*; Springer, Nova York.
- [39] Gardiner, H.W. (1997), *Statistical Analysis Methods for Chemists. A Software-based Approach*; The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- [40] Howell, D.C. (1999), *Fundamental statistics for the behavioural sciences*; Duxbury Resource Center, 4th Ed.
- [41] Pavel, C., et al. (2013), Use of Chemical Indicators of Beer Aging for Ex-post Checking of Storage Conditions and Prediction of the sensory Stability of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 12670-12675.

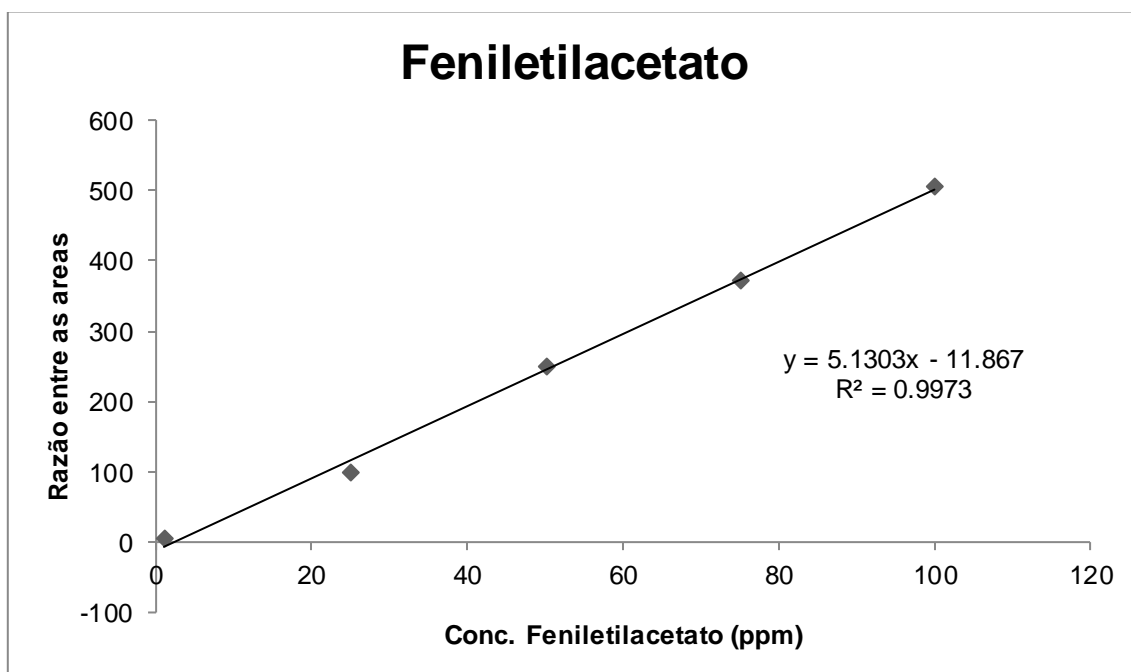
Anexos

Anexo 1

Reta de calibração do Feniletilacetato:

Conc. Feniletilacetato (ppm)	Area		Conc. 3- Oct ppm	Razão* (Areas)
	PheEtA	3-Oct		
1	3730483	21382215	23	4,012732498
25	111495091	25810591	23	99,35406334
50	158216016	14589010	23	249,4321663
75	180562163	11167404	23	371,8796015
100	325497851	14863079	23	503,6944615

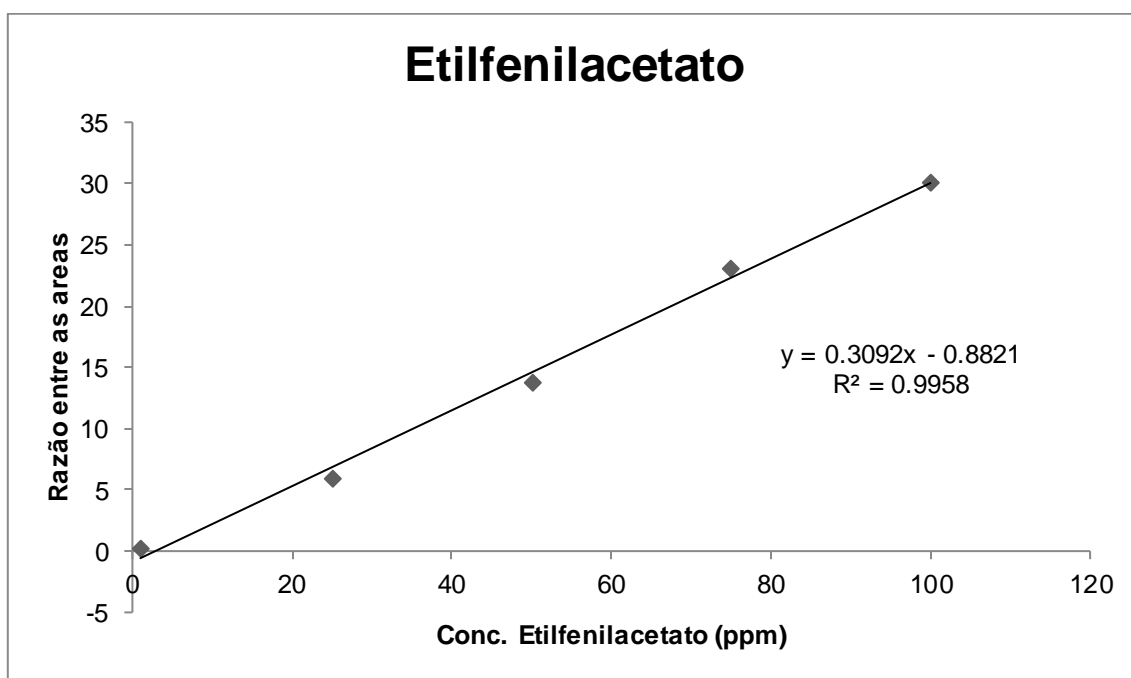
*Em que a razão (áreas) = $\frac{\text{Area PheEtA} \times \text{Conc. 3-Oct}}{\text{Area 3-Oct}}$



Reta de calibração do Etilfenilacetato:

Conc. Etilfenilacetato (ppm)	Area		Conc. 3-Oct ppm	Razão* (Areas)
	EtPheA	3-Oct		
1	233339	21382215	23	0,250993501
25	6742254	25810591	23	6,008070176
50	8779124	14589010	23	13,84054518
75	11192127	11167404	23	23,05091864
100	19424963	14863079	23	30,05932681

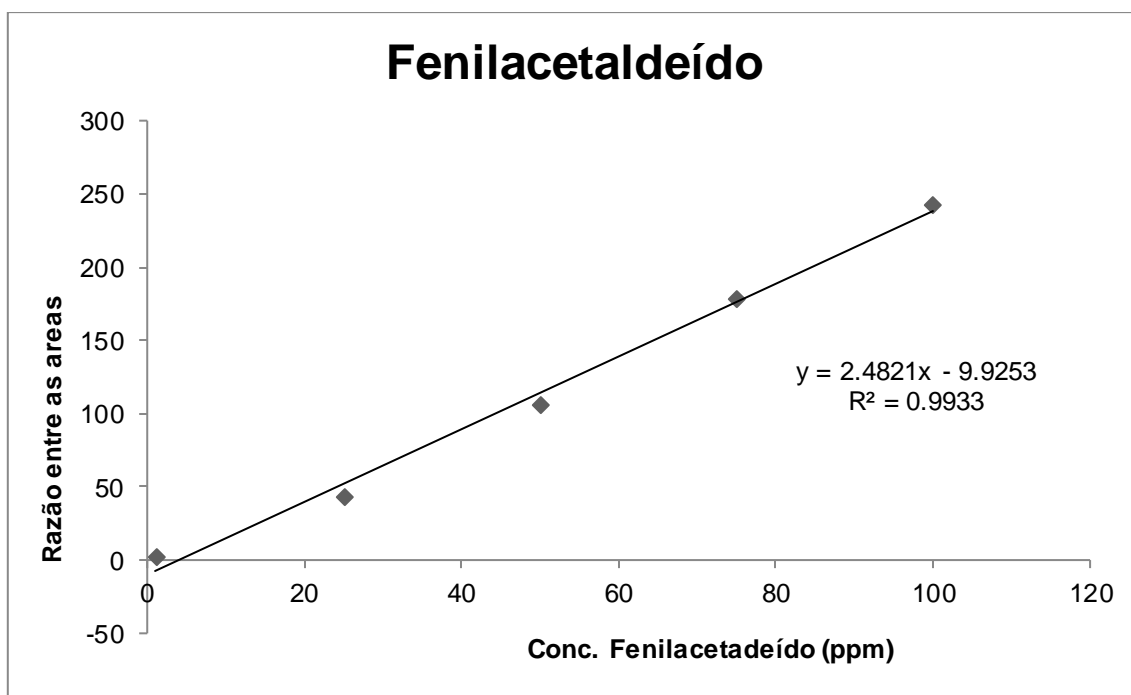
*Em que a razão (áreas) = $\frac{Area\ EtPheA \times Conc.\ 3-Oct}{Area\ 3-Oct}$



Reta de calibração do Fenilacetaldéido:

Conc. Fenilacetaldéido (ppm)	Area		Conc. 3-Oct ppm	Razão* (Areas)
	PheAct	3-Oct		
1	2264925	21382215	23	2,436289926
25	48804031	25810591	23	43,48961684
50	67557865	14589010	23	106,5069456
75	86600196	11167404	23	178,358776
100	156760461	14863079	23	242,5803296

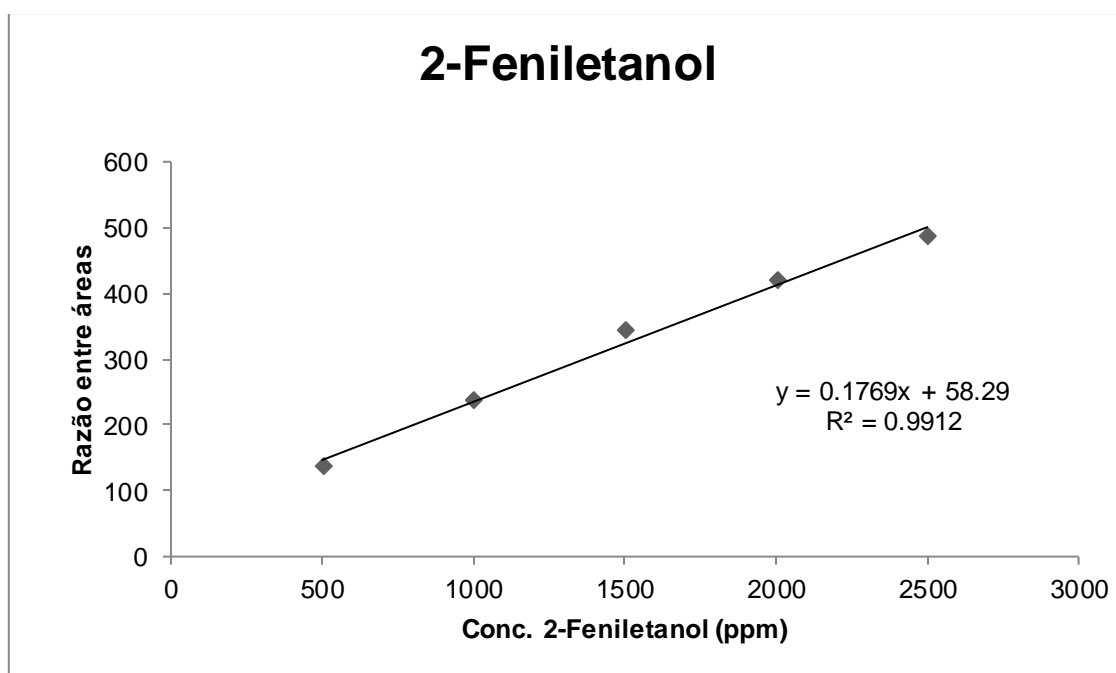
*Em que a razão (áreas) = $\frac{Area\ PheAct \times Conc.\ 3-Oct}{Area\ 3-Oct}$



Reta de calibração do 2-Feniletanol:

Conc. 2-Feniletanol (ppm)	Area		Conc. 3-Oct ppm	Razão* (Áreas)
	2-PheOH	3-Oct		
500	266536006	45065819	23	136,0305498
1000	496313958	48519545	23	235,2705705
1500	748555032	50427898	23	341,4135115
2000	970643917	53200607	23	419,6344995
2500	1167123858	55208936	23	486,2228958

*Em que a razão (áreas) = $\frac{\text{Area 2-PheOH} \times \text{Conc. 3-Oct}}{\text{Area 3-Oct}}$



Anexo 2

Ficha de Análise Sensorial

Serie nº	Amostra nº	Identificação	Avaliação Global	Termo	P	Avaliação Global

AVALIAÇÃO GLOBAL

- 9** Produto de ótica qualidade
8-6 Normal para este tipo de produto
5-3 Com defeitos aceitáveis p/ este tipo de produto
2 Com defeitos não aceitáveis p/ este tipo de produto
3 Com defeitos tão graves que requerem ação imediata

PESOS

- 1** Ligeiro
2 Moderado
3 Forte

Data: ____/____/____

Assinatura:

Escala antiga -3/+1		Escala 1-9 (CRC)			
Total flavour score	Characteristics	Total flavour score	Characteristics	Weight of individual off-flavours	Total weight of off-flavours
+1 SAT	Exceptionally good	9	Excellent		
0 SAT	Normal for this type of beer	8	Very Good	Max 1	Max 2
		7	Good	Max 2	Max 3
		6	Satisfactory	Max 2 Max line with 2	Max4
-1 NQS	With faults within an acceptable range	5	Fair	Max 3 Min1 line with 2	Min 3 Max 5
		4	Not Quite Satisfactory	Max 3 Min 1 line with 2 Max 1 line with 3	Min 3 Max 7
		3	Poor	Max 4 Min 1 line with 3	Min 3 Max 9
-2 NOT SAT	Whit faults that cannot be accepted	2	Bad	Min 1 line with 4 Or Min 2 lines with 3	Min 4 Max 15
-3 NOT SAT	With faults so grave that immediate action is suggested	1	Undrinkable	Min 1 line with 5 Or Min 2 lines with 3	Min 5

The colour code illustrates the different categories of samples: Green=SAT; Yellow=NQS and Red=NS

Anexo 3

Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do feniletilacetato

Tabela 15: Teores de feniletilacetato registados durante a monitorização do impacto da temperatura de armazenamento

Condições de armazenamento		[Feniletilacetato] (µg/L)				
		Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E
Cerveja Fresca		131	135	134	125	116
4°C	3 meses	136	138	378	510	308
	6 meses	415	398	404	540	441
20°C	3 meses	218	243	227	116	173
	4 meses	270	302	358	239	330
	5 meses	405	459	471	369	361
	6 meses	508	599	591	449	504
37°C	3 dias	228	293	268	288	254
	5 dias	253	300	288	289	263
	7 dias	330	367	295	291	264
	14 dias	419	425	509	492	490

Impacto da temperatura de armazenamento na concentração do fenilacetaldeído

Tabela 16: Teores de fenilacetaldeído registados durante a monitorização do impacto da temperatura de armazenamento

Condições de armazenamento		[Fenilacetaldeído] (µg/L)				
		Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E
Cerveja Fresca		82	82	83	85	82
4°C	3 meses	85	82	90	98	92
	6 meses	119	105	97	112	99
20°C	3 meses	86	85	88	92	84
	4 meses	88	88	90	92	89
	5 meses	89	95	94	93	95
	6 meses	92	97	95	95	96
37°C	3 dias	91	89	86	88	88
	5 dias	92	90	89	90	89
	7 dias	93	92	90	91	90
	14 dias	98	104	97	92	96

Anexo 4

Impacto do teor de oxigénio na concentração do feniletilacetato

Tabela 17: Teores de feniletilacetato registados durante a monitorização do impacto do teor de oxigénio.

Condições de armazenamento		[Feniletilacetato] (µg/L)				
		Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E
Cerveja Fresca		131	135	134	125	116
4°C	3 semanas	384	360	426	398	358
	3 meses	412	405	432	484	379
20°C	3 semanas	188	155	189	187	133
	3 meses	808	447	519	681	421
37°C	7 dias	329	361	392	376	321
	14 dias	343	371	411	391	331

Impacto do teor de oxigénio na concentração do fenilacetaldeído

Tabela 18: Teores de fenilacetaldeído registados durante a monitorização do impacto do teor de oxigénio.

Condições de armazenamento		[Fenilacetaldeído] (µg/L)				
		Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E
Cerveja Fresca		82	82	83	85	82
4°C	3 semanas	102	102	94	96	97
	3 meses	123	105	94	98	100
20°C	3 semanas	85	84	85	96	86
	3 meses	1105	1010	1254	655	399
37°C	7 dias	100	98	98	107	97
	14 dias	108	103	111	108	107

